

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA KRYŚ

**ANÁLISE DE ANTÍGENOS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS DE DIFERENTES  
POTÊNCIAS POR *WESTERN BLOT* E ELISA**

CURITIBA  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA KRYSS

**ANÁLISE DE ANTÍGENOS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS DE DIFERENTES  
POTÊNCIAS POR *WESTERN BLOT* E ELISA**

Projeto de pesquisa realizado no TECPAR - Juvevê,  
apresentado à disciplina TCC II do Curso de Biomedicina  
do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientadora: Lucy Ono

Co-orientadora: Luciene Airy Nagashima

CURITIBA  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Laboratório de Produção de Kits Diagnósticos (LPD), Controle de Qualidade (CQ) e ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e todos os colaboradores, por possibilitar a realização do projeto em suas instalações.

À Fundação Araucária pelo fomento do projeto e fornecimento de bolsa de iniciação científica para sua realização.

À minha orientadora, Prof. Lucy Ono e à minha co-orientadora Luciene Airy Nagashima, pela orientação e conselhos.

Às professoras Patricia R. Dalzoto e Adriana F. Mercadante pela correção do trabalho escrito e participação da banca de defesa do trabalho.

À Anna Luiza Breda Pepplow, pelo auxílio durante a realização do projeto, cuja assistência foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

À minha família e amigos pelo apoio, conselhos e incentivo, sem vocês nada seria possível.

## RESUMO

A tuberculose bovina é uma doença crônica que acomete principalmente bovinos e bubalinos, constituindo um problema de saúde pública, além de ocasionar prejuízos para a pecuária. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal prevê, dentre as medidas necessárias para controle dessas doenças, a realização de testes para diagnóstico nos animais. O diagnóstico dos animais doentes é feito pelo teste tuberculínico, que utiliza como antígeno o derivado proteico purificado (PPD). A tuberculina PPD é uma mistura complexa de proteínas cuja composição e mecanismos envolvidos na resposta imune da reação do teste tuberculínico ainda não estão totalmente esclarecidos. No presente estudo foram analisadas tuberculinas PPD bovinas que tiveram baixa reatividade no teste intradérmico em cobaias sensibilizadas, comparando-as com amostras positivas, por *western blot* e ELISA. As tuberculinas de alta potência apresentaram, na eletroforese, bandas de aproximadamente 9, 12, 15, 18 e 23 kDa. No *western blot*, foram evidenciadas bandas de aproximadamente 22, 30 e 41 kDa. As tuberculinas com as potências mais baixas apresentaram um enfraquecimento das bandas, principalmente das bandas abaixo de 30 kDa, o que indica que as proteínas presentes nessas bandas podem ser essenciais para a imunogenicidade das tuberculinas PPD bovinas. Corroborando com esses resultados, o ELISA mostrou um maior reconhecimento de anticorpos para as matérias primas de alta potência, sendo que as matérias primas de baixa potência que apresentam um enfraquecimento das bandas abaixo de 30 kDa tiveram o menor reconhecimento. A identificação dessas proteínas pode auxiliar na elucidação de quais proteínas são efetivas na reação intradérmica, possibilitando o desenvolvimento de testes diagnósticos mais específicos.

Palavras-chave: derivado proteico purificado; *Mycobacterium bovis*; ensaio de potência; eletroforese; ensaio imunoenzimático.



## ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a chronic disease that affects mainly bovines and buffaloes, consisting in a public health issue, besides causing economic losses to livestock. The National Program of Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis predicts, among the necessary measures to control these diseases, the realization of diagnostic tests. The diagnosis of affected animals is made through the tuberculin test, which uses the purified protein derivative (PPD) as an antigen. The PPD tuberculin is a complex mixture of proteins and its composition and mechanisms involved in the immune response of the tuberculin test are not totally elucidated. In the present study, PPD tuberculin samples that showed low reactivity in the intradermic test, performed in sensitized guinea pigs, were analyzed and compared to positive samples, by western blot. The high potency tuberculin samples presented protein bands in approximately 9, 12, 15, 18 and 23 kDa in the electrophoresis gel. In the western blot, protein bands circa 22, 30 and 41 kDa were demonstrated. The tuberculin samples with the lowest potency results showed fading of protein bands, especially the ones below 30 kDa. This indicates the proteins represented by these bands are essential for the bovine PPD tuberculin's immunogenicity. Corroborating these results, in the ELISA, results for the high potency samples showed a better antibody recognition when compared to the low potency samples. The samples that showed fading protein bands had the least antibody recognition. The identification of said proteins could help elucidate which proteins are effective in the intradermic reaction, enabling the development of more specific diagnostic tools.

Key-words: purified protein derivative; *Mycobacterium bovis*; potency assay; electrophoresis; immunoenzymatic assay.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	8
1.1 OBJETIVO GERAL	10
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	11
2.1 <i>Mycobacterium bovis</i>	11
2.1.1 Antígenos micobacterianos	12
<b>2.2 TUBERCULOSE BOVINA</b>	13
2.2.1 Tuberculose bovina como zoonose	19
2.3 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E DA TUBERCULOSE ANIMAL (PNCEBT)	20
2.3.1 Vacinação contra a tuberculose animal	22
2.4 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA	23
2.4.1 Teste tuberculínico	26
2.5 TUBERCULINA PPD BOVINA	29
2.5.1 Produção da tuberculina PPD bovina e controle por ensaio de potência biológica	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
3.1 SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO PROTEICA DAS AMOSTRAS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS	34
3.2 SOROS DE COBAIAS	34
3.3 PADRONIZAÇÃO	35
3.4 ELETROFORESE E <i>WESTERN BLOT</i>	36
3.5 ELISA	36
<b>4 RESULTADOS</b>	38
4.1 AMOSTRAS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS SELECIONADAS E DETERMINAÇÃO PROTEICA	38
4.2 PADRONIZAÇÃO	38
4.3 ELETROFORESE	41
4.4 <i>WESTERN BLOT</i>	43
4.5 ELISA	44
<b>5 DISCUSSÃO</b>	46
<b>6 CONCLUSÃO</b>	51

<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1 – RESULTADOS DE ANOVA DE UMA VIA (GRAPHPAD PRISM 7) UTILIZADOS PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 2 – RESULTADOS DO TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE TUKEY (GRAPHPAD PRISM 7) UTILIZADOS PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é considerada uma doença crônica, que acomete principalmente bovinos e bubalinos, e em menor proporção, seres humanos. É causada por *Mycobacterium bovis* e associada a lesões granulomatosas, que estão presentes principalmente no trato respiratório, tanto superior quanto inferior, e linfonodos associados, mas que podem estar presentes em quaisquer tecidos (BRASIL, 2006; POLLOCK, et al., 2001; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005).

Atualmente a tuberculose bovina é mais prevalente em países em desenvolvimento (BRASIL, 2006). Estima-se que cerca de 200 mil bovinos, de um total de 170 milhões, estejam infectados no Brasil (KANTOR; RITACO, 1994; LEITE, et al., 2003). Ainda que os animais infectados por *M. bovis* geralmente não apresentem sinais clínicos (MURAKAMI, et al., 2009), essa doença gera prejuízos para a pecuária. Estimativas apontam que a produtividade de animais infectados cai cerca de 10% a 25% (BRASIL, 2006; RUGGIERO, et al., 2007).

Além disso, principalmente em países subdesenvolvidos, *M. bovis* tem caráter zoonótico, infectando seres humanos, sobretudo indivíduos imunossuprimidos, como no caso de co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (DABORN; GRANGE, 1993). Na América Latina, estima-se que de todos os casos de tuberculose em seres humanos, 8% sejam causados por *M. bovis*. No Brasil, levando em consideração os casos anuais de tuberculose, isso significa que cerca de 6,8 mil dos casos de tuberculose humana poderiam ser atribuídos a essa zoonose (VALENTE; VALE; BRAGA, 2011).

Pela sua importância econômica e zoonótica, a tuberculose bovina é uma doença alvo de programas de controle e erradicação por todo o mundo. Esses programas baseiam-se principalmente no diagnóstico dos animais doentes e subsequente abate. No Brasil, em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Além de diminuir a incidência e prevalência das doenças, o programa objetiva também criar propriedades certificadas como livres ou monitoradas para brucelose e tuberculose (BRASIL, 2006).

A metodologia padronizada para detectar a tuberculose bovina é o teste intradérmico baseado na reação de hipersensibilidade do tipo tardio à tuberculina - derivado proteico purificado (PPD). A prova tuberculínica consiste na injeção intradérmica da tuberculina e detecção da reação formada no local (OIE, 2009). A tuberculina PPD bovina é produzida a

partir da precipitação de proteínas do cultivo de *M. bovis* em meio sintético. Entretanto, mesmo sendo amplamente utilizada para o diagnóstico, pouco se sabe sobre a composição da PPD bovina (BORSUK, et al., 2009) e quais proteínas são responsáveis pela imunogenicidade desses antígenos de composição complexa.

Antes de ser comercializada, a tuberculina PPD bovina passa por vários testes de controle, obedecendo às normas da Portaria 64/1994 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Um dos testes é o de potência biológica, realizado em cobaias sensibilizadas comparando-se as reações produzidas pela injeção intradérmica de várias diluições do produto a ser examinado, devendo resultar em um valor entre 80 e 120% quando comparado com o padrão de referência (BRASIL, 1994).

O Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) produz cerca de 3,8 milhões de doses de tuberculinas PPD bovinas por ano e é o principal responsável por fornecer o antígeno ao MAPA para a realização de testes que fazem parte do PNCEBT. Durante o ano de 2014, foram observados, na produção do Laboratório de Produção de Kits Diagnósticos, TECPAR – Juvevê, lotes de tuberculinas PPD bovinas com resultados insatisfatórios no teste de potência, mesmo com concentração proteica adequada.

Considerando a tuberculina bovina e seu papel no controle e erradicação da tuberculose bovina - uma doença infecciosa com grandes impactos à saúde animal e humana, e prejuízos para a pecuária, um dos setores mais importantes para a economia do país (23% PIB em 2014) (PORTAL PLANALTO, 2015) - a caracterização de sua composição proteica e das proteínas responsáveis pela reação tuberculínica se torna importante. Assim, no presente trabalho, objetivou-se analisar se há diferença nos antígenos presentes nas tuberculinas PPD de potência baixa e satisfatória, por *western blot* e por ensaio imunoenzimático (ELISA). A comparação de perfis de eletroforese, *western blot* e ELISA das diferentes amostras de tuberculinas poderia elucidar o porquê dos resultados insatisfatórios no teste de potência, e aperfeiçoar a qualidade e o controle do processo de produção desses antígenos. Além disso, comparando esses diferentes perfis, seria possível ter uma indicação de quais proteínas são importantes para a imunogenicidade das tuberculinas, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de testes mais específicos para o diagnóstico da tuberculose em bovinos.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e analisar os antígenos de tuberculinas PPD bovinas de diferentes potências por *western blot* e ELISA.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar proteínas presentes nas amostras de tuberculinas PPD bovinas;
- Padronizar condições de eletroforese para tuberculinas PPD bovinas;
- Caracterizar e comparar qualitativamente perfis eletroforéticos de amostras de tuberculinas PPD bovinas de diferentes potências;
- Padronizar condições de *western blot* para tuberculinas PPD bovinas;
- Caracterizar e comparar qualitativamente perfis de *western blot* de amostras de tuberculinas PPD bovinas de diferentes potências;
- Padronizar condições de ELISA para tuberculinas PPD bovinas;
- Comparar quantitativamente resultados de ELISA de amostras de tuberculinas PPD bovinas de diferentes potências

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Mycobacterium bovis*

*Mycobacterium bovis* foi isolado por Theobald Smith, em 1896 (SMITH, 1898), entretanto foi nomeado como tal apenas em 1970, por Karlson e Lessel (KARLSON; LESSEL, 1970). Foi reconhecido como um bacilo diferente de *Mycobacterium tuberculosis* por suas diferenças morfológicas e características biológicas. *M. bovis* apresenta um crescimento lento, menos vigoroso do que *M. tuberculosis*, e colônias discretas. Entretanto, apresenta maior virulência e uma maior patogenicidade em coelhos, se comparado a *M. tuberculosis* (SMITH, 1898).

É um bacilo álcool-ácido resistente, imóvel, não produtor de esporos e aeróbio estrito (OPROMOLLA, D. V. A., 2000; GRANGE, 2001). É o agente causador da tuberculose bovina e pertence à ordem Actinomycetales, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. Essa micobactéria apresenta um amplo espectro de patogenicidade, infectando além de bovinos e bubalinos, o ser humano e também outros mamíferos (ROXO, 1996; RUGGIERO, et al., 2007; BRASIL, 2006). A bactéria foi isolada de diversos animais como búfalos, equinos, primatas, suínos, camelídeos sul-americanos, ovelhas, texugos, gambás, esquilos, dentre outros (OIE, 2009; revisado por LISLE; MACKINTOSH; BENGIS, 2001).

*M. bovis* faz parte do denominado “complexo *Mycobacterium tuberculosis*”, grupo que também inclui *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. microti*, e que é responsável pela maior parte dos casos de tuberculose humana e animal (RUNYON, 1981; ROXO, 1996; BRASIL, 2006; RUGGIERO, et al., 2007). Embora apresentem tropismo por diferentes animais, as bactérias do complexo *M. tuberculosis* apresentam sequências de RNA 16S virtualmente idênticas (SREEVATSAN, et al., 1997), sendo diferenciadas através de diferenças fisiológicas e de sua virulência (GORDON, et al., 2001). Sobrenadantes de cultura e extratos celulares de diferentes cepas de *Mycobacterium* spp. (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* Erdman, *M. bovis* BCG Chicago e *M. bovis* BCG Copenhagen) apresentam, em sua maioria, proteínas equivalentes entre espécies. Entretanto, são vistas diferenças na presença e intensidade de pontos proteicos na eletroforese 2D (JUNGBLUT, et al., 1999).

A análise do genoma de *M. bovis* (4.345.492 pb) mostra uma similaridade de nucleotídeos de mais de 99,95% quando comparado ao genoma de *M. tuberculosis*, sendo a maioria das proteínas discordantes entre as duas espécies proteínas de membrana e secretadas.

*M. bovis* apresenta deleções e alterações nas proteínas da família ESAT-6 (Rv2346c, Rv2347c, Rv3619c, Rv3620c, Rv3890c e Rv3905c), além de apresentar uma maior expressão de MPB70 e MPB83 (GARNIER, et al., 2003).

O genoma de *M. bovis* é composto de 3952 genes codificantes de proteínas (GARNIER, et al., 2003). Dentre as proteínas identificadas em sobrenadantes de cultura e extrato celular de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG e *M. bovis*, encontram-se MPT64/MPB64 (Rv1980c), MPT51 (Rv3803c), os antígenos 85A (Rv3804c), 85B (Rv1886c) e 85C (Rv0129c), antígeno 84 (Rv2145c) ESAT-6 (Rv3875), EF-Tu (Rv0685), MoxR (Rv1479), CFP10 (Rv3874), TRB-B (Rv3659c), TPX (Rv1932), MPB70 (Rv2875), CFP21 (Rv1984c), glicoproteína Apa (Rv1860). Também foram encontradas proteínas como GroES (Rv3418c), HspX (Rv2031c), GroEL2 (Rv0440), L7/L12 (Rv0652) e DnaK (Rv0350) (MATTOW, et al., 2003; JUNGBLUT, et al., 1999; ALITO, et al., 2003; BERRÊDO-PINHO et al., 2011), sendo as quatro últimas também encontradas na fração de membrana de *M. bovis*, juntamente com HPTX (Rv0563), HSP (Rv0251c), CFP29 (Rv0798c), e GroEL1 (Rv3417c) (MATTOW, et al., 2007). Beltrán, et al. (2010), identificaram GroEL1, DnaK, EF-Tu e SahH (Rv3248c) dentre as proteínas mais abundantes separadas em uma eletroforese 2D de um extrato de proteínas totais de *M. bovis* AN5 (BELTRÁN, et al., 2010). Ainda, também são identificadas proteínas conservadas de função hipotética, como no estudo de Berrêdo-Pinho, et al. (2011), no qual 24% das proteínas dos filtrados de cultura de *M. bovis* BCG não apresentavam função conhecida, dentre elas TB27.3 (Rv0577), TB18.6 (Rv2140c), Rv2626c (BCG2653c) e TB15.3 (Rv1636) (BERRÊDO-PINHO et al., 2011).

### 2.1.1 Antígenos micobacterianos

Várias frações de micobactérias podem agir como antígenos, estimulando o sistema imune. Extratos de micobactéria são compostos por várias moléculas, como lipídios, polissacarídeos e proteínas (DANIEL; JANICKI, 1978). Proteínas secretadas são propostas como importantes para a patogênese de *Mycobacterium* (ROOK, et al., 1986; HORWITZ, et al., 1995) e já foram descritas como antígenos de células T (POLLOCK; ANDERSEN, 1997; SKJOT, et al., 2000; VORDERMEIER, et al., 1999), que incluem CFP10 (antígeno de filtrado de cultura, EsxB), MPT64/MPB64 (proteína imunogênica), MPT63 (proteína imunogênica extracelular), ESAT-6 (alvo antigênico secretório precoce EsxA) e o complexo antigênico 85 (MATTOW, et al. 2003).

Antígenos de *Mycobacterium* spp. podem ser divididos em antígenos citoplasmáticos,



de parede celular e antígenos secretados. Antígenos de parede celular incluem antígenos não-proteicos, como lipoarabinomanana, micolil arabinogalactana e glicolípido fenólico. Além da lipoproteína de superfície MPT83. Antígenos citoplasmáticos incluem GroEL (chaperonina de 60 kDa), GroES (chaperonina de 10 kDa), DnaK (HSP70, proteína *heat shock* 70 kDa), SodA (superóxido dismutase) e Bfr (bacterioferritina) (revisado por THOLE; JANSSEN; YOUNG, 1999; LEW, et. al, 2011 – TubercuList).

Antígenos secretados incluem MPT70/MPB70 (importante proteína imunogênica secretada), MPT63, proteínas do complexo antigênico 85 - 85A (MPT44, micolil transferase 85A), 85B (MPT59, micolil transferase 85B), 85C (MPT51, micolil transferase 85C), ESAT-6 e MPT64/MPB64 (revisado por THOLE; JANSSEN; YOUNG, 1999; LEW, et. al, 2011 – TubercuList). Outros antígenos proteicos incluem PhoS (lipoproteína periplasmática ligadora de fosfato, PstS1), TB23, F29 e MPT40 (fosfolipase C associada à membrana, PlcA) (revisado por YOUNG, et al., 1992).

## 2.2 TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa que acomete principalmente bovinos e bubalinos, e é caracterizada por lesões granulomatosas (tubérculos) que se apresentam geralmente no trato respiratório. Essa doença ocorre em vários países do mundo, porém principalmente em países em desenvolvimento, concentrando-se na América do Sul, que possui a maior população de bovinos (BRASIL, 2006; RUGGIERO, et al., 2007; ROXO, 1997). No Brasil, a tuberculose bovina encontra-se disseminada por todo o território nacional. A doença apresenta maior frequência em rebanhos leiteiros, se comparada a rebanhos de corte (BRASIL, 2006).

Dados de notificações oficiais, de um período de 9 anos (1989 a 1998), indicam que, em média, 1,3% de animais estejam infectados (BRASIL, 2006). Em uma análise anterior, de 1986, a taxa de infecção encontrada variou de 0,9 a 2,9% dos animais testados (KANTOR; RITACCO, 1994). Já Roxo (2004 citada por KANTOR; RITACCO, 2006) estimou cerca de 0,58% de animais reativos na região Sul, 0,92% no Sudeste, 0,37% no Centro-Oeste, 3,31% no Nordeste e 3,62% na região Norte do país (KANTOR; RITACCO, 2006). Mais recentemente, análises isoladas em diferentes cidades e estados do país mostram variação de prevalência da tuberculose bovina entre 0,5% no Espírito Santo (LAVAGNOLI, et al., 2010), 1,51% em Passo Fundo, RS (POLETTTO, et al., 2004) e 3,3% em Mossoró, RN (OLIVEIRA, et al., 2007).

Globalmente, são estimados prejuízos na pecuária decorrentes dessa doença de mais de 3 bilhões de dólares por ano (STEELE, 1995 citado por SCHILLER, et al., 2010). Além de causar morte, animais infectados apresentam diminuição da conversão alimentar (redução de 20%), menor produção de leite (redução de 10 a 18%), descarte precoce, condenação de carcaças no abate, diminuição de 5% dos nascimentos, além da perda de credibilidade da instituição em que ocorrem casos da doença (HOMEM, 2003 citada por VALENTE; VALE; BRAGA, 2011; BRASIL, 2006).

A tuberculose bovina tem como agente etiológico *M. bovis* (BRASIL, 2006; POLLOCK, et al., 2001; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005). As manifestações clínicas da infecção por *M. bovis* são distintas, sendo individualizadas para diferentes animais. Isso ocorre devido às diferentes respostas imunes que cada animal pode apresentar. Assim, a doença se manifesta clinicamente num espectro que vai de infecções auto-limitadas até infecções generalizadas (MURAKAMI, et al., 2009).

A maioria dos animais infectados por *M. bovis* não apresentam quadro clínico aparente e são detectados apenas por testes diagnósticos, como o tuberculínico (MURAKAMI, et al., 2009). Os que apresentam lesões geralmente são acometidos em linfonodos pulmonares, pulmão (LEPPER; PEARSON, 1973) e linfonodos craniais, além do fígado, intestino, baço, pleura e peritônio (OIE, 2009). As lesões dos pulmões se encontram principalmente nos lobos caudais, perto da pleura, e podem ser uni ou bilaterais (revisado por NEILL; POLLOCK; BRYSON; HANNA, 1994). Estas começam aparecendo na junção entre bronquíolos e alvéolos, sendo disseminadas para os alvéolos e linfonodos brônquicos de forma hematogênica ou pelas vias aéreas (BRASIL, 2006; NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001). Ainda, a doença pode ser disseminada para o resto do corpo, podendo manifestar-se em qualquer tecido (BRASIL, 2006), como membranas mucosas (podendo não ser aparente), trato digestório (úlceras e nódulos) e pode gerar complicações como endometrite (MURAKAMI, et al., 2009). Além disso, a tuberculose bovina pode se tornar generalizada, tanto na fase inicial da doença quanto numa fase tardia (BRASIL, 2006). Essa generalização é caracterizada pela presença de nódulos miliares - pequenos tubérculos - por todo o corpo (MURAKAMI, et al., 2009) e pode ocorrer de forma miliar, de maneira abrupta, devido à grande quantidade de bacilos na circulação; ou de maneira protraída, que ocorre por via linfática/sanguínea, na qual a bactéria dissemina-se por praticamente todos os tecidos (BRASIL, 2006).

Quando macroscópicas, as lesões ou tubérculos são nódulos pequenos (1 a 3 cm de diâmetro), de cor branca, em bubalinos, a amarelada, em bovinos, não apresentando odor

(CASSIDY, et al., 1998; BRASIL, 2006; NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001; OIE, 2009). Podem ter aspecto caseoso, caseo-calcário, calcificado e mais raramente purulento, sendo envoltas por uma cápsula fibrosa (BRASIL, 2006; OIE, 2009). Como a doença é crônica, de progressão lenta, há raros sinais clínicos. Em animais com doença pulmonar avançada, pode haver dispnéia aparente pelo enfraquecimento das funções respiratórias. Além disso, bovinos podem apresentar tosse, infertilidade (no caso de endometrite), mastite, caquexia, diarreia intermitente e constipação (no caso do envolvimento do trato gastrointestinal) e hiperplasia de linfonodos (BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; OIE, 2009). Em casos terminais, podem ocorrer emagrecimento extremo e angústia respiratória (OIE, 2009).

A introdução de *M. bovis* em rebanhos e sua transmissão a animais saudáveis ocorre por meio de outros bovinos ou bubalinos infectados. Em países onde a doença encontra-se quase erradicada, os reservatórios selvagens tornam-se importantes fontes de re-infecção dos bovinos. Esses reservatórios são importantes fatores para a dificuldade de erradicação da doença, além do aumento do comércio e movimentação de bovinos, e aumento do tamanho dos rebanhos (BRASIL, 2006; SCHILLER, et al., 2010).

É importante ressaltar que a maioria dos bovinos infectados liberam bacilos antes mesmo de apresentarem sinais clínicos e lesões (NEILL, et al., 1992), podendo apresentar micobactérias nas fezes, urina, corrimento nasal, leite, secreções vaginais e sêmen (RUGGIERO, et al., 2007). Porém, a excreção de micobactérias nas fezes, leite e urina dos animais é considerada insignificante – 78% das fezes de vacas tuberculosas apresentaram-se negativas para *M. bovis* (WILLIAMS, HOY, 1930; NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001). De fato, apenas 1% dos animais tuberculosos eliminam a bactéria no leite de forma intermitente (revisado por GRANGE; YATES, 1994). Contudo, a prevalência de animais que apresentam o bacilo nas secreções nasais e escarro vai de 8,7 a 20% (KANTOR; BIOCH; ROSWURM, 1978; PALMER; WATERS, 2001).

A transmissão de *M. bovis* entre bovinos pode ocorrer de diversas maneiras: via respiratória, alimentar, congênita, cutânea e venérea (revisado por PRITCHARD, 1988), havendo grande influência de fatores como clima, ambiente, práticas agrícolas existentes, idade e comportamento do animal (revisado por NEILL, et al., 1994). Características do local de criação dos animais, como práticas sanitárias, tamanho do rebanho, densidade populacional, são importantes na introdução da doença, assim como sua propagação dentro de um rebanho (BRASIL, 2006).

A principal via de infecção é a aérea, que ocorre em cerca de 90% dos casos (BRASIL, 2006; M'FADYEAN, 1910). A infecção por essa via estabelece-se pela inalação

de gotículas aerossóis provenientes de tosse ou secreção nasal de um animal com infecção pulmonar ativa. Essas partículas aerossóis, com micobactérias presentes no núcleo, são pequenas o bastante para alcançar os alvéolos pulmonares, onde são depositadas e iniciam a infecção (WELLS; RATCLIFFE; CRUMB, 1947; MURAKAMI, et al., 2009).

Já a infecção por via oral é mais importante em bezerros amamentados por vacas que apresentam mastite tuberculosa (NEILL, et al., 1994), e pode ocorrer também por água, fômites e pastagem contaminada (POLLOCK; NEILL, 2002), mas esses apresentam menor importância na transmissão da doença. Ainda, são necessárias doses muito maiores de bactéria para ocorrer a infecção oral, se comparada à infecção por via aérea (WELLS; RATCLIFFE; CRUMB, 1947; MURAKAMI, et al., 2009). As infecções congênita e venérea são mais raras. A transmissão de maneira congênita ocorre quando há infecção no útero da fêmea, ou também, mais raramente, por deglutição de líquido amniótico infectado. A transmissão venérea ocorre se existirem lesões tuberculosas nos órgãos reprodutivos, e em casos de epididimite e endometrite tuberculosa (NEILL, et al., 1994; MURAKAMI, et al., 2009; ROXO, 1997; BRASIL, 2006).

Após a exposição inicial a *M. bovis*, há o desenvolvimento de uma resposta imune inata, na qual macrófagos inativados fagocitam as micobactérias, podendo eliminá-las ou não (RUGGIERO, et al., 2007; MURAKAMI, et al., 2009). O papel do macrófago apresenta ações antagônicas: ele é responsável por eliminar as micobactérias, porém também é o hospedeiro preferido pela forma intracelular destas – *M. bovis* consegue manter seu metabolismo de maneira ativa em macrófagos bovinos, diminuindo sua viabilidade (ALDWELL; WEDLOCK; BUDDLE, 1996; LIÉBANA, et. al, 2000). Ainda, a bactéria é eliminada no interior do macrófago por ações do lisossomo, superóxido e peptídeos bactericidas. Ao mesmo tempo, bacilos da tuberculose viáveis diminuem ou impedem a fusão de seus fagossomos com lisossomos (ARMSTRONG; HART, 1971), através de glicolípídeos micobacterianos, como forma de sobrevivência intracelular. Devido a tais fatos, a interação inicial dos macrófagos com os bacilos é o que determina o desenvolvimento da infecção e seu curso (MURAKAMI, et al., 2009; POLLOCK; NEILL, 2002). Assim, o destino das micobactérias depende da sua virulência, carga infectante e atividade bactericida dos macrófagos (BRASIL, 2006; RUGGIERO, et al., 2007; RUSSEL, et al., 1997).

Quando a micobactéria se estabelece nos macrófagos, ela pode se multiplicar até provocar a morte da célula, gerando lesão tecidual devido à liberação de lisossomos. Com a liberação de novos bacilos para o meio extracelular, esses serão fagocitados/infectarão novos macrófagos e monócitos provenientes da corrente sanguínea (atraídos por antígenos

bacterianos e citocinas secretadas por linfócitos) gerando um foco de infecção (MURAKAMI, et al., 2009; BRASIL, 2006). A lesão primária, juntamente com a lesão de linfonodos adjacentes é denominada complexo primário, que em casos de infecção aérea refere-se à infecção dos pulmões e seus linfonodos adjacentes (MURAKAMI, et al., 2009; NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001).

De 2 a 3 semanas após a infecção por *M. bovis*, desenvolve-se uma reação de hipersensibilidade tardia, que é efetiva para controlar as micobactérias e sua multiplicação (POLLOCK; NEILL, 2002; BRASIL, 2006). Ocorre a formação de um granuloma ou tubérculo, mediada por células T (CASSIDY, et al., 1998), que é primeiramente formado por neutrófilos, que são substituídos por macrófagos (MURAKAMI, et al., 2009; BRASIL, 2006). Os macrófagos presentes na lesão tomam a forma de células epitelióides, que fundem-se formando células gigantes e multinucleadas (células de Langerhans). Essas células formam o centro do granuloma, que é cercado de monócitos, linfócitos e plasmócitos. A lesão é encapsulada por tecido conectivo, e progride para granuloma necrótico caseoso, que pode apresentar calcificação no seu centro (CASSIDY, et al., 1998; MURAKAMI, et al., 2009; NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001; POLLOCK; NEILL, 2002).

A formação do granuloma está associada à resposta imune celular, e o influxo de macrófagos está associado ao mecanismo de eliminação da bactéria. Os antígenos bacterianos secretados são apresentados aos linfócitos T (POLLOCK; NEILL, 2002), que são ativados e se diferenciam em células T *helpers* (Th) do tipo CD4+ ou citotóxicas CD8+. As células T CD4+ ativam os macrófagos pulmonares, a partir da produção de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (MURAKAMI, et al., 2009) – essencial para ativar funções microbidas em macrófagos e aumentar a quantidade de intermediários de espécies reativas de oxigênio (POLLOCK; NEILL, 2002; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005). Por sua vez, as células T CD8+ estão relacionadas à eliminação de células infectadas pela micobactéria, agindo de maneira citotóxica e liberando as micobactérias para que sejam fagocitadas por macrófagos ativados. Além disso, as células T CD8+ também produzem IFN- $\gamma$  - importante para a manutenção de sistemas responsáveis pela eliminação do patógeno (MURAKAMI, et al., 2009; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005).

Com a formação do granuloma, as lesões podem persistir, ser estabilizadas ou podem ser completamente curadas (NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001). Lesões são completamente curadas quando há a eliminação das bactérias completamente pelo sistema imune. Nesses casos, o tubérculo se reduz a uma pequena massa de tecido cicatricial hialino

(MURAKAMI, et. al, 2009). Se há a formação de granulomas caseosos, eficientes em controlar o microrganismo mas não eliminá-lo totalmente, os bacilos podem sobreviver nos tubérculos durante anos, sem progressão da doença em uma condição de latência (MURAKAMI, et al., 2009; POLLOCK; NEILL, 2002). Durante esse estado, não há desenvolvimento de sinais clínicos já que em um ambiente caseoso, que se torna hipóxico, os bacilos são impedidos de se multiplicarem (MURAKAMI, et al., 2009). Essas lesões latentes podem ser reativadas (POLLOCK; NEILL, 2002), e quando isso ocorre, o animal já apresenta uma resposta imune desenvolvida contra a tuberculose, sendo a lesão mais restrita e de progressão mais lenta (MURAKAMI, et al., 2009).

As lesões podem persistir quando não há controle imunológico dos bacilos, como no caso de o granuloma caseoso se tornar liquefeito, por efeito de enzimas originadas de macrófagos e neutrófilos. Nesse caso, a multiplicação dos bacilos é abundante já que esse ambiente é um ótimo meio de cultura. Uma vez que a lesão não está mais bem delimitada, as bactérias não se encontram tão bem contidas, o que possibilita a disseminação dessas para outras áreas, pela via hematogênica, gerando a forma disseminada da doença. Pelo fato de os bacilos estarem menos contidos, indivíduos que apresentam granulomas liquefeitos são mais contagiosos do que aqueles que apresentam granulomas caseosos (MURAKAMI, et al., 2009).

A progressão da doença após a formação do granuloma é influenciada pela resposta imune. Existem evidências que tanto células T CD4+ quanto T CD8+ previnem a reativação da tuberculose bovina. Uma resposta predominantemente Th1 garante o estado de latência das micobactérias, e animais com essa resposta apresentam lesões contidas ao trato respiratório superior. Mudanças de respostas predominantemente Th1 para respostas Th2 associam-se à reativação e progressão da doença, produção de anticorpos e anergia de respostas celulares (RITACCO, et al., 1991; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; POLLOCK; NEILL, 2002).

Em estágios mais avançados da doença, há o desenvolvimento de anticorpos, que são associados à progressão da patogenia. Mesmo sendo geralmente desconsiderados na imunidade contra micobactérias intracelulares, há evidências que anticorpos podem ter um papel importante na proteção contra a doença. Em doenças avançadas e possivelmente disseminadas, os animais se tornam anérgicos quanto à resposta mediada por células mas os níveis de anticorpos podem estar aumentados na circulação (POLLOCK; NEILL, 2002).

### 2.2.1 Tuberculose bovina como zoonose

Além de ser o agente etiológico da tuberculose bovina, *M. bovis* também pode causar tuberculose em seres humanos, a tuberculose zoonótica. Ravenel (1902) isolou *M. bovis* de um paciente que foi a óbito por meningite tuberculosa (RAVENEL, 1902), e Savage (1929) descreveu que *M. bovis* era capaz de ocasionar todos os sintomas de tuberculose no homem (revisado por PRITCHARD, 1988). A doença ocorre sobretudo em locais com altas taxas de infecção de bovinos, e locais onde os produtos de origem animal não são submetidos a controle sanitário. Isso porque os seres humanos são infectados principalmente a partir de bovinos infectados, e pelo consumo de leite e derivados crus (BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; MODA, et al., 1996; THOEN, LOBUE, KANTOR, 2006).

Geralmente, a exposição e infecção da população acontece pelo consumo de derivados bovinos contaminados, sendo a rota de infecção a via oral. Indivíduos com deficiência imunológica, idosos e crianças são os mais suscetíveis. A infecção, nesses casos, ocorre pela tonsila ou mucosa intestinal, e a doença apresenta forma extrapulmonar – podendo apresentar aumento dos linfonodos mesentéricos ou cervicais. Pessoas imunocomprometidas geralmente apresentam casos graves e disseminados da doença (GRIFFITH, 1937; BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; MODA, et al., 1996; GRANGE, 2001).

Os níveis de infecção são maiores em populações com risco ocupacional, que trabalham em contato com animais infectados (magarefes e tratadores de animais), e em populações rurais que vivem onde há infecção de bovinos. Nesse caso, a rota de infecção é a pulmonar – tanto a partir de animais vivos e infectados, quanto a partir de manipulação de carcaças. A exposição causa tuberculose pulmonar. Quando o contato com o patógeno ocorre por inoculação na pele, geralmente aparecem lesões benignas e auto-limitadas na pele, tendões e linfonodos (BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; MODA, et al., 1996; ROXO, 1997; GRANGE, 2001).

O desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina e a pasteurização do leite, fizeram com que a rota oral de infecção se tornasse menos importante recentemente. Porém, a infecção por via aérea ainda é frequente na população com risco ocupacional – o que é um problema maior em países produtores de carne com alta incidência de tuberculose bovina (THOEN, LOBUE, KANTOR, 2006). Atualmente, o aparecimento da tuberculose zoonótica em países em desenvolvimento é raro (GRANGE, 2001; MÜLLER, et al., 2013). Entretanto, países que tem reservatórios silvestres de *M. bovis* ainda apresentam persistência da doença, como é o caso do Reino Unido (MÜLLER, et al., 2013).

Em países onde a tuberculose bovina ainda apresenta grande prevalência, sendo eles principalmente países em desenvolvimento, a doença ainda se mostra importante. A situação é agravada pela epidemia de HIV nesses países, já que pessoas imunocomprometidas tendem a desenvolver a doença ativa. Além disso, acredita-se que o HIV facilite a transmissão e progressão da tuberculose (DABORN, GRANGE, 1993; BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; MODA, et al., 1996; ROXO, 1997; GRANGE, 2001; MÜLLER, et al., 2013).

A tuberculose humana causada por *M. bovis* tem sinais e sintomas clínicos, patogenia e lesões idênticas às causadas em seres humanos por *M. tuberculosis* (GRIFFITH, 1937), porém a forma bovina da bactéria tende a causar doença extrapulmonar. Assim, exames clínicos e baciloscopia (BAAR) do escarro não conseguem distinguir o agente etiológico da doença, o que só é possível pelo isolamento e subsequente identificação do agente por métodos moleculares, como genotipagem, ou bioquímicos (MÜLLER, et al., 2013; GRANGE, 2001). Isso gera uma subnotificação de *M. bovis* em seres humanos, o que prejudica estudos sobre a epidemiologia da doença, importantes em áreas endêmicas para rastrear a transmissão de *M. bovis* para seres humanos (THOEN, LOBUE, KANTOR, 2006; LEITE, et al., 2003).

### 2.3 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E DA TUBERCULOSE ANIMAL (PNCEBT)

O controle da tuberculose bovina se baseia, geralmente, em políticas de diagnóstico e abate sanitário de animais, juntamente com a vigilância de carcaças em abatedouros, procurando lesões tuberculosas. Essa estratégia é eficaz se não existem outros possíveis reservatórios do patógeno – nesses casos, é necessário o controle desses reservatórios, o que geralmente é feito pela diminuição de sua população. Países que conseguiram erradicar com sucesso a tuberculose bovina, basearam seus programas de erradicação nos rebanhos, ao invés do diagnóstico individual de animais, uma vez que a acurácia dos testes é limitada (SCHILLER, et al., 2010; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; RUGGIERO, et al., 2007; OIE, 2009; MURAKAMI, et al., 2009).

O controle da tuberculose bovina foi instituído no Brasil em 2001, com a criação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ele tem como objetivo aumentar a competitividade da pecuária do país. No âmbito da tuberculose, pretende diminuir a incidência e prevalência dessa zoonose e seus impactos para a saúde



animal e humana. Ainda, procura oferecer produtos de baixo risco sanitário ao criar propriedades certificadamente livres de tuberculose e propriedades monitoradas para a doença (BRASIL, 2006).

O PNCEBT se baseia em bloqueios de pontos estratégicos no ciclo de infecção da micobactéria. O principal foco é a erradicação das fontes de infecção, que são identificadas pela triagem de bovinos utilizando o teste tuberculínico (SCHILLER, et al., 2010). Também pode haver outras fontes de infecção, como o homem e animais silvestres, por isso deve-se monitorar a saúde dos trabalhadores e possíveis fontes silvestres de *M. bovis*. Outra medida do programa é o teste durante a aquisição de novos animais, sendo feitos testes tuberculínicos antes de os bovinos serem introduzidos aos rebanhos. É importante também, monitorar a situação de animais que participam de feiras e exposições. Boas medidas de higiene em todas as instalações, e instalações bem arejadas e expostas à luz solar são importantes para prevenir a contaminação do espaço físico. O controle de animais abatidos pela presença de lesões tuberculosas complementa o monitoramento da propriedade (BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009; ROXO, 1997).

O PNCEBT é composto de medidas sanitárias compulsórias, que dizem respeito à brucelose bovina, e de adesão voluntária. As últimas consistem na certificação de propriedades livres ou monitoradas para a brucelose e tuberculose bovina. Essas certificações servem para agregar valor aos produtos provenientes dessas propriedades, o que gera um incentivo aos produtores para aderir ao programa (BRASIL, 2006; RUGGIERO, 2010).

O processo de certificação consiste na realização do teste tuberculínico de todos os animais do rebanho, sacrificando aqueles que se mostrarem positivos. O rebanho é testado até que se mostre livre de animais positivos por 3 testes ao longo de 9 meses. Após tais resultados, a propriedade é certificada livre de tuberculose bovina, e deve monitorar intensamente a doença – tanto os animais do rebanho quanto aqueles que serão introduzidos ao mesmo (BRASIL, 2006; MURAKAMI, et al., 2009). Como o modelo de rebanhos no Brasil torna complicadas as políticas de certificação de propriedades livres de tuberculose, devido ao grande número de animais, existe o certificado de propriedade monitorada para tuberculose bovina – apenas para rebanhos de gado de corte. Nessa certificação testam-se amostras da população: se essas forem livres da doença, a propriedade é monitorada para tuberculose. Se houver animais positivos no teste tuberculínico, os animais não antes incluídos na amostragem são testados, e os que tiverem resultado positivo são abatidos. Então a propriedade é considerada monitorada para a tuberculose (BRASIL, 2006).

### 2.3.1 Vacinação contra a tuberculose animal

A erradicação da tuberculose bovina fundamenta-se principalmente no diagnóstico da doença e subsequente abate de animais positivos. Esse tipo de iniciativa mostrou-se bem sucedida na redução da prevalência e erradicação da tuberculose bovina em vários países desenvolvidos (BUDDLE, et al., 2011; BUDDLE, 2001; SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001). Dessa forma, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal não contempla a vacinação de rebanhos entre as estratégias para o combate da tuberculose bovina (BRASIL, 2006).

Programas de vacinação tornam-se interessantes em contextos de países nos quais a erradicação de tuberculose bovina é comprometida pela presença de reservatórios selvagens de *M. bovis*, como na Nova Zelândia, pela presença do gambá-de-escova (*Trichosurus vulpecula*), Reino Unido com o texugo (*Meles meles*) e Michigan, USA com o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (BUDDLE, et al., 2011; LISLE, et al., 2002). Nessas situações, uma alternativa de controle seria a vacinação dos reservatórios selvagens, principalmente no caso de espécies protegidas (LISLE, et al., 2002). Ainda, em muitos países da África, o controle baseado em diagnóstico e sacrifício não seria aceitável econômica e socialmente (SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001).

A vacinação tem como objetivo tornar os animais vacinados resistentes ou menos suscetíveis ao desenvolvimento da doença, diminuindo as chances de disseminação de *M. bovis* (CHAMBERS, et al., 2014; SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001). Segundo Buddle, et al. (1995), a vacinação de bovinos com BCG, via subcutânea ou respiratória, induz uma resposta protetiva, tendo os animais vacinados menor presença de lesões quando comparados aos não vacinados. Ainda, animais vacinados por via respiratória não apresentam lesões no trato respiratório, o que poderia contribuir para a diminuição da transmissão da doença entre animais (BUDDLE, et al., 1995).

A vacina *Bacille Calmette Guérin* (BCG) é a principal candidata para uso em rebanhos (CHAMBERS, et al., 2014), e mostra eficácia variável em bovinos (SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001), sendo eficaz na redução da disseminação hematogênica de micobactérias. Além disso, apresenta-se segura, com baixo custo de produção e pode ser administrada por diversas vias. Entretanto, animais vacinados por BCG apresentam reatividade no teste tuberculínico, portanto seriam determinados como positivos e abatidos em programas de controle da doença baseados no diagnóstico e abate (SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001; BUDDLE, 2001; BUDDLE, et al., 2011).

Outras vacinas para a tuberculose bovina incluem BCG modificada, que visa maior segurança e diminuição da reatividade no teste tuberculínico; vacinas de *M. bovis* inativado, que apresentam maior segurança, entretanto não se mostraram protetivas, induzindo resposta Th2 (GRIFFIN, et al., 1999); vacinas de subunidades adjuvantes, que poderiam não induzir resposta no teste tuberculínico, entretanto estimulam produção de anticorpos e fraca resposta celular; e vacinas de DNA (SKINNER; WEDLOCK; BUDDLE, 2001; BUDDLE, 2001; BUDDLE, et al., 2011).

## 2.4 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

O diagnóstico da tuberculose bovina é um fator essencial dos programas de controle e erradicação da doença. Ele pode ser feito através de diversos métodos, que podem ser divididos em diretos - detectam e identificam o agente etiológico no material biológico; e indiretos - detectam a resposta imune ao patógeno (BRASIL, 2006). Ainda, as técnicas podem ser divididas em *in vivo* e *post mortem*. Técnicas aplicadas *in vivo* são obrigatórias para a produção e comercialização de leite e animais, e incluem o teste tuberculínico juntamente com o exame clínico. Técnicas *post mortem* incluem exames bacteriológicos e histopatológicos, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ROXO, 1997).

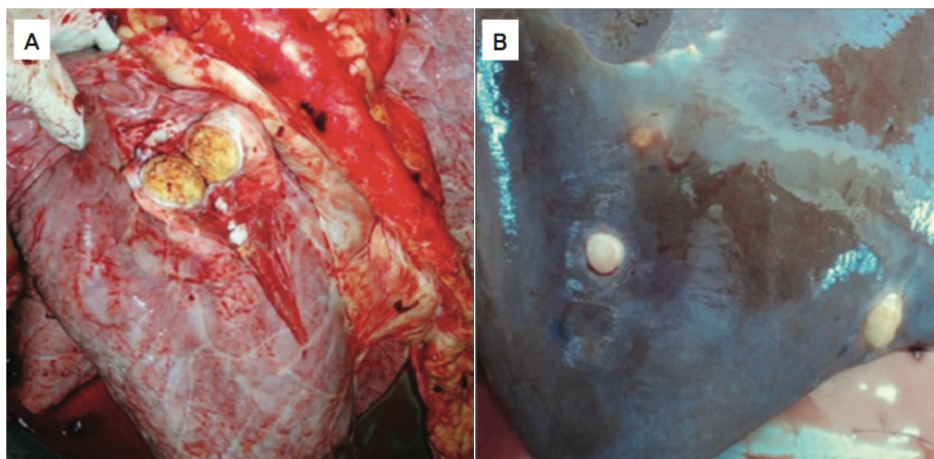
Nenhum dos métodos disponíveis para diagnóstico da tuberculose bovina é totalmente eficaz - cada um apresenta limitações e indicações para o uso (BRASIL, 2006). Portanto, para a garantia do diagnóstico devem ser feitos testes complementares aliados aos sinais clínicos (RUGGIERO, 2010). Os métodos mais utilizados para a detecção de animais tuberculosos são o teste de reação à tuberculina, bacteriologia e histopatologia (BRASIL, 2006).

O diagnóstico clínico é um método que procura os sinais clínicos mais frequentes, como: cansaço e baixa capacidade respiratória, caquexia progressiva, tosse seca, curta e repetitiva, além de linfadenomegalia. Entretanto, esse método tem valor relativo, já que sinais clínicos muitas vezes não estão aparentes e são inespecíficos, além de aparecerem apenas em estágios avançados da doença (RUGGIERO, 2007). Esse método é importante em casos de tuberculose avançada, já que os animais não respondem mais ao teste tuberculínico (BRASIL, 2006).

O diagnóstico anatomopatológico investiga a presença de lesões granulomatosas, ou tubérculos (FIGURA 1), sendo um diagnóstico *post mortem*. Ele faz parte da vigilância passiva de programas de controle da doença, que investiga presença de lesões em carcaças. Essa vigilância permite encontrar animais que possam estar expostos à doença (SCHILLER,

et al., 2010). Porém, o teste apresenta limitações como o fato de essas lesões não serem exclusivas da tuberculose bovina, e nem sempre animais que reagem ao teste tuberculínico apresentam lesões – as lesões podem não ter sido encontradas ou estar em estágios iniciais (BRASIL, 2006).

FIGURA 1 - LESÕES GRANULOMATOSAS INDICATIVAS DE TUBERCULOSE



FONTE: SOUZA, et al. (2014), adaptado.

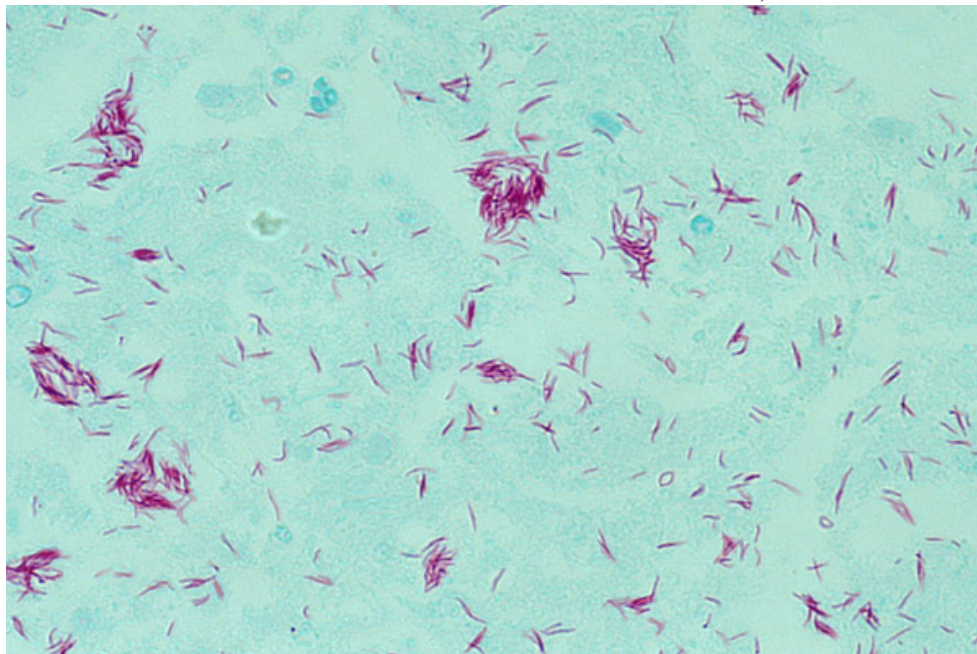
NOTA: Lesões típicas de tuberculose encontradas em carcaças de animais positivos no teste de reação à tuberculina, abatidos no estado de Minas Gerais. Nódulo encontrado no pulmão (A) e fígado (B) (SOUZA, et al., 2014).

O diagnóstico bacteriológico é o único método que pode ser utilizado para um diagnóstico definitivo de tuberculose bovina. Amostras podem ser analisadas à fresco, pela coloração de Ziehl Neelsen (BAAR) que evidencia bacilos álcool-ácido resistentes (FIGURA 2). Entretanto, como as lesões geralmente apresentam baixa carga bacteriana, nem sempre o exame à fresco os detecta. Portanto, deve-se partir para o isolamento de *M. bovis* em cultura (BRASIL, 2006; OIE, 2009).

A identificação da micobactéria é feita a partir do isolamento das colônias bacterianas a partir de cultura de material proveniente de animais com suspeitas de tuberculose. A morfologia da colônia e padrões de crescimento podem ser presuntivos de *M. bovis*, mas isso deve ser confirmado por baciloscopia (BAAR) (OIE, 2009). O método apresenta limitações, pois há dificuldades para isolar *M. bovis* dos animais, além de possibilitar apenas a identificação de micobactérias, mas não de espécie. Se o teste bacteriológico é feito por isolamento, ele despende tempo (até 90 dias), porque *M. bovis* cresce de maneira lenta em cultura. Por essas limitações, esse teste só é feito em casos específicos, como: confirmação de tuberculose em locais onde esta não era detectada anteriormente; animais que reagiram ao teste tuberculínico mas não apresentam lesões macroscópicas; pesquisa de micobactérias em

amostras de leite; confirmação de que lesões encontradas são tuberculosas, entre outras (BRASIL, 2006).

FIGURA 2 – LÂMINA CORADA PELA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN, EVIDENCIANDO BAAR.



FONTE: PATHOLOGY OF INFECTIOUS DISEASES

NOTA: Lâmina preparada a partir de lesões granulomatosas provenientes de inoculação intravesical de *M. bovis* BCG em homem de 56 anos. BAAR em magenta.

Novos métodos indiretos têm sido desenvolvidos, como a procura de antígenos bovinos específicos para *M. bovis* – evitando uma reação cruzada com outras espécies. Nesse quesito, o antígeno ESAT-6 foi testado e mostrou um máximo de 82% de sensibilidade e 100% de especificidade, contra máximo de 86% e 90%, respectivamente no teste com tuberculinas (POLLOCK, et al., 2003). Outro ensaio empregado analisa a quantidade de IFN- $\gamma$ , após a exposição do sangue total à PPD bovina (ROTHER, et al., 1990). O IFN- $\gamma$  é secretado durante a resposta imune, sendo importante nos estágios iniciais da infecção (POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; SCHILLER, et al., 2010; OIE, 2009). Esse ensaio tem como vantagens ser simples, rápido, sensível (ROTHER, et al., 1990) além da probabilidade de realização várias vezes sem intervalos, ser menos invasivo que as tuberculinas (RUGGIERO, et. al, 2007) e não mudar o status imunológico do animal (ROTHER, et al., 1990). Porém, há grande possibilidade de falsos positivos em animais jovens, e esse teste ainda apresenta alto custo (SCHILLER, et al., 2010).

### 2.4.1 Teste tuberculínico

O teste tuberculínico é considerado o teste de referência para o diagnóstico da tuberculose bovina, sendo o teste prescrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para comércio internacional (SCHILLER, et al., 2010). É o método de escolha por ser sensível, simples, prático e de baixo custo, apesar de apresentar certas limitações como dificuldade de interpretação de resultados e baixa uniformização (RUGGIERO, et al., 2007; SCHILLER, et. al, 2010). Esse teste se baseia na resposta do animal frente a injeção intradérmica de tuberculinas (MONAGHAN, et al., 1994) e pode revelar infecções de 3 a 8 semanas após a exposição a *Mycobacterium* (BRASIL, 2006).

São utilizados como antígenos do teste um derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis*, a PPD bovina, e um derivado de *M. avium*, a PPD aviária. O teste tuberculínico é feito na prega caudal do animal (FIGURA 3), em animais de corte, e na região cervical – teste cervical simples (FIGURA 4) em rebanhos leiteiros, utilizando PPD proveniente de *M. bovis* para uma triagem. A pele da região cervical é mais sensível a uma reação de tuberculina, e por isso muitas vezes utiliza-se uma dose maior nos testes de prega caudal. O teste de prega caudal é positivo quando o animal apresenta qualquer aumento de espessura na prega inoculada com tuberculina PPD bovina. Já o teste cervical simples é considerado positivo quando a diferença da espessura da pele ( $\Delta$ , sendo  $\Delta$  = espessura da pele após inoculação – espessura da pele antes da inoculação) estiver de acordo com critérios pré-estabelecidos, demonstrados na TABELA 1 (MONAGHAN, et al., 1994; BRASIL, 2006; SCHILLER, et al., 2010; OIE, 2009).

TABELA 1 – INTERPRETAÇÃO DO TESTE CERVICAL SIMPLES

CARACTERÍSTICAS DA REAÇÃO				
$\Delta B$ (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	Interpretação
0 a 1,9	-	-	-	Negativo
2,0 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita dor	Macia	Exsudato, necrose	Positivo
$\geq$ a 4,0	-	-	-	Positivo

FONTE: BRASIL (2006)

NOTA:  $\Delta B$  significa a diferença de espessura de pele observada na inoculação de PPD bovina.

Animais positivos ou com suspeita de tuberculose bovina são submetidos ao teste comparativo com PPD aviária (FIGURA 5), de 60 a 90 dias depois do primeiro teste. A comparação com a resposta à PPD aviária ajuda a distinguir se a resposta obtida no teste com PPD bovina é devido a presença de *M. bovis* ou se é uma reação a espécies do ambiente, por

meio de antígenos comuns a outras micobactérias. A diferença de espessura da pele é calculada para PPD bovina ( $\Delta B$ ) e aviária ( $\Delta A$ ), e interpreta-se os resultados seguindo a TABELA 2.

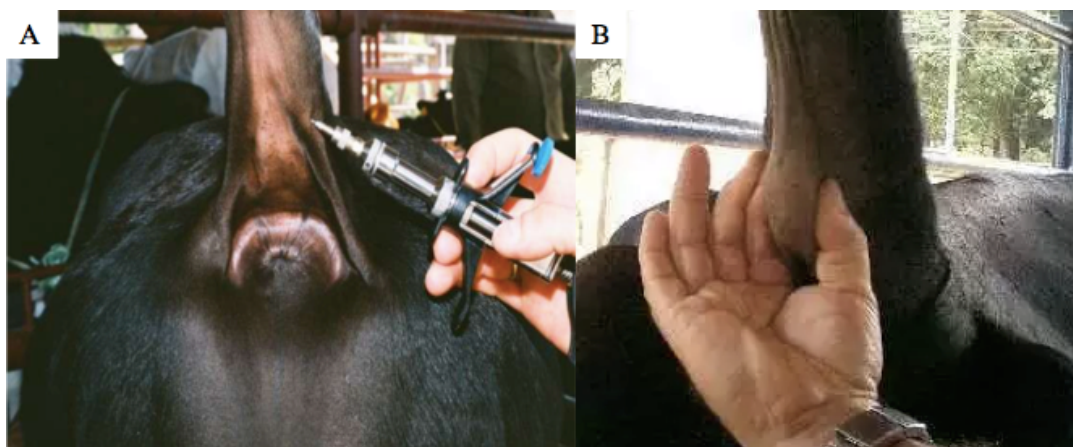
TABELA 2 – INTERPRETAÇÃO DO TESTE CERVICAL COMPARATIVO

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	$< 0$	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

FONTE: BRASIL (2006)

Se os animais forem positivos nos testes confirmatórios, eles são direcionados ao abate. No caso de resultados inconclusivos, os animais são re-testados após 60 a 90 dias, e se resultados inconclusivos aparecerem novamente, os animais são encaminhados ao abate (BRASIL, 2006; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; RUGGIERO, et. al, 2007; SCHILLER, et al., 2010; OIE, 2009).

FIGURA 3 – TESTE DA PREGA CAUDAL

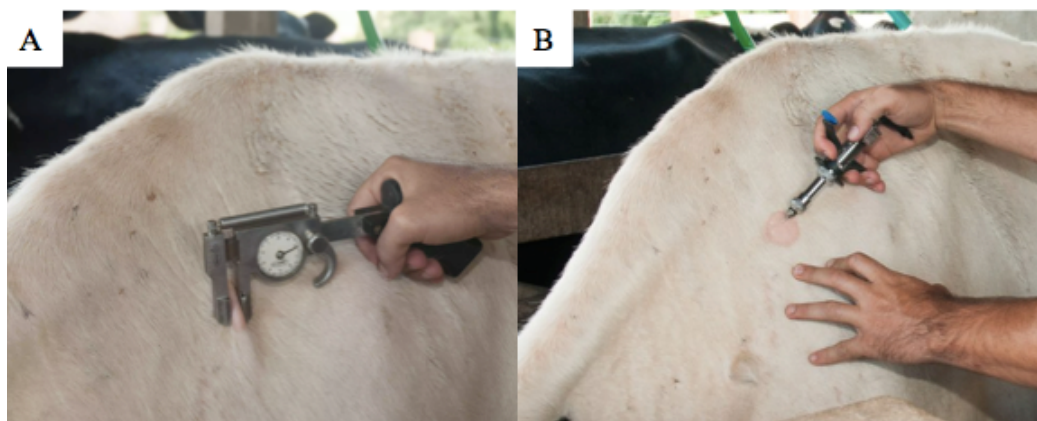


FONTE: BRASIL (2006)

NOTA: Inoculação de PPD bovina no teste da prega caudal (A), teste positivo (B), caracterizado por qualquer aumento de espessura na prega inoculada (BRASIL, 2006).



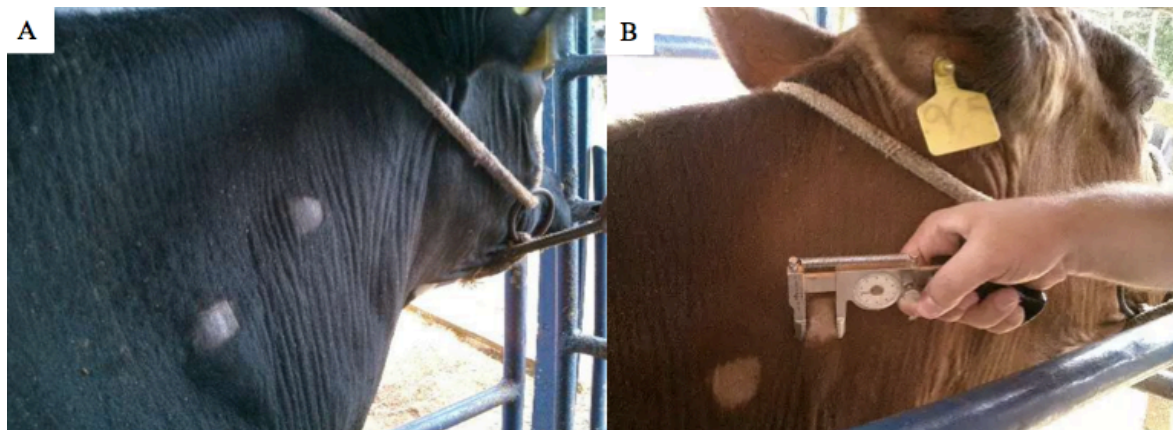
FIGURA 4 – TESTE CERVICAL SIMPLES



FONTE: ARAUCÁRIA GENÉTICA BOVINA (2014)

NOTA: Medida da espessura da pele antes da inoculação (A) e inoculação da PPD bovina (B).

FIGURA 5 – TESTE CERVICAL COMPARATIVO



FONTE: BRASIL (2006)

NOTA: Teste cervical comparativo positivo (A) e inconclusivo (B). A PPD aviária é inoculada cranialmente e a PPD bovina caudalmente (BRASIL, 2006).

O teste tuberculínico baseia-se em uma resposta de hipersensibilidade tardia (tipo IV), que ocorre após a injeção dos antígenos, pela presença de linfócitos T já sensibilizados pela micobactéria, em animais já expostos ao patógeno (POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; ROXO, 1997; SCHILLER, et al., 2010). Essa resposta indica que o animal está infectado por bacilos virulentos, atenuados, inativados, vacinais ou ambientais (BRASIL, 2006). A reação positiva do teste é caracterizada pelo aumento da espessura da pele no local de inoculação, medida 72h após a injeção – quando há o ponto máximo de endurecimento e edema. Essa reação é decorrente de edema e um infiltrado de células mononucleares. Esse edema ocorre quando as tuberculinas são fagocitadas por macrófagos e apresentadas na superfície celular, em moléculas de MCH de classe II. Quando linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1) já sensibilizados reconhecem esses antígenos, secretam citocinas, em especial IFN- $\gamma$  que recrutam leucócitos e



monócitos, transformando os últimos em macrófagos, que eliminam as tuberculinas (BRASIL, 2006; POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005; ROXO, 1997; SCHILLER, et al., 2010).

Há a possibilidade de falsos negativos, já que certos animais, mesmo infectados, não reagem ao teste tuberculínico. Isso ocorre quando há excesso de antígenos circulantes, que gera uma imunossupressão, inibindo a produção de citocinas necessárias para a ativação de macrófagos, e o animal se torna anérgico quanto à resposta celular. Altas concentrações do antígeno podem existir por sucessivas inoculações deste ou durante os estágios finais da doença (BRASIL, 2006; LEPPER; PEARSON; CORNER, 1977). Além disso, animais recém infectados também podem ser falsos negativos, já que o desenvolvimento da imunidade específica pode demorar de 3 a 6 semanas. Falsos positivos podem ocorrer por inflamação local ou sensibilização por outras micobactérias, com reação cruzada de antígenos (OIE, 2009).

Segundo Roxo (1997), o teste tuberculínico apresenta grande especificidade: de 96% a 98% no teste caudal simples e 99% no teste comparativo, com PPD aviária (ROXO, 1997). Porém, a performance do teste pode variar com diferentes doses de tuberculina, local de aplicação e maneira de interpretação do teste, fazendo com que esse teste apresente um grande espectro de especificidade e sensibilidade (SCHILLER, et al., 2010). Para que seja utilizado como um método diagnóstico em campanhas de erradicação da doença, deve-se padronizar a produção dos antígenos, a realização do teste e critérios de leitura e interpretação dos resultados (BRASIL, 2006).

## 2.5 TUBERCULINA PPD BOVINA

O derivado proteico purificado da tuberculina (PPD) bovina é um extrato cru e complexo de tubérculo-proteínas derivadas de filtrados de cultivo de *M. bovis* esterilizados pelo calor (RENNIE; FILION; SMART, 2010; BRASIL, 2006), que é utilizado como antígeno no teste de reação à tuberculina (RUGGIERO, et al., 2007). Esse filtrado contém uma grande quantidade de antígenos – muitos comuns a todas as espécies de micobactérias (MONAGHAN, et al., 1994).

Primeiramente desenvolvida por Robert Koch, em 1890, a “tuberculina velha”, ou *old tuberculin* era um extrato cru fervido de cultura de *Mycobacterium*, concentrado por evaporação (BORSUK, et. al, 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010). Essa tuberculina induzia uma resposta não específica, por ter em sua composição proteínas provenientes do

meio de cultura (ROXO, 1997). Por esse motivo também apresentava variações entre os diferentes lotes. Houve um aprimoramento desses parâmetros com a criação da HCSM (*heat concentrated synthetic medium*), que não apresentava suas proteínas misturadas com proteínas do meio de cultura. A precipitação das proteínas, feita por ácido tricloroacético ou por sulfato de amônio, possibilitou a produção de PPD, nos anos de 1940, por um processo de produção padronizado, em meio sintético, e são as tuberculinas mais utilizadas atualmente (MONAGHAN, et al., 1994; BORSUK, et al., 2009; ROXO, 1997).

Embora amplamente utilizada no diagnóstico de tuberculose bovina, os componentes da PPD bovina são pouco conhecidos, já que tentativas de especificar os antígenos presentes nessa mistura não tiveram sucesso. A desnaturação de proteínas que ocorre durante o processo de produção dificulta sua caracterização (BORSUK, et al., 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010).

A análise de filtrados de meio de cultura de *M. bovis* e *M. tuberculosis* não expostos ao calor, possibilitaram a identificação de mais de 800 tubérculo-proteínas, que contemplam proteínas secretadas e não secretadas, exportadas e componentes somáticos das bactérias (RENNIE; FILION; SMART, 2010). Um estudo de sobrenadante de culturas de *M. tuberculosis* apontou que apenas 31% das proteínas identificadas são descritas como proteínas secretadas, potencialmente secretadas ou localizadas extracelularmente. Quando analisadas as proteínas mais abundantes no sobrenadante, 73% delas são assim descritas (MATLOW, et al., 2003).

Estudos feitos por Rowland, et al. (1999), Borsuk, et al. (2009) e Rennie, Filion e Smart (2010) com PPDs esterilizadas por autoclave, mostram que esse processo desnatura e degrada as proteínas presentes no extrato, fazendo com que análises por eletroforese das tuberculinas mostrem um rastro de proteínas de baixo peso molecular (ROWLAND; RUCKERT; CUMMINGS, 1999; BORSUK, et al., 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010), que apresenta-se na faixa de 45 a 25 kDa, com algumas bandas mais evidentes (~10 e 23kDa) (RENNIE; FILION; SMART, 2010).

Borsuk, et al. (2009) analisaram diferentes tuberculinas PPD bovinas (Brasil – PPD BR, Reino Unido – PPD UK) por meio de espectrometria de massas, e Cho, et al. (2015) analisaram a PPD bovina da Coreia do Sul (PPD KR). Dessas análises foram observadas, no total, 95 proteínas na PPD UK, 43 na PPD BR (BORSUK, et al., 2009) e 271 na PPD KR (CHO, et al., 2015), sendo a sua maioria de baixo peso molecular (entre 10 e 50 kDa) (BORSUK, et al., 2009). Delas, 36 são antígenos T dependentes, na PPD UK, 20 na PPD BR e 42 na PPD KR (TABELA 3).

TABELA 3 – ANTÍGENOS T DEPENDENTES IDENTIFICADOS NO PROTEOMA DE TUBERCULINAS  
PPD BOVINAS DO REINO UNIDO, BRASIL E CORÉIA DO SUL

Gene <i>M. tuberculosis</i>	Ortólogo	Proteína	Peso molecular (kDa)	PPD UK	PPD BR	PPD KR
Rv0009	Mb0009	CFP22/PpiA	19,2	-	-	+
Rv0125	Mb0130	MTB32a	34,9	+	-	+
Rv0129c	Mb0134c	Antígeno 85C	36,8	+	-	+
Rv0350	Mb0358	DnaK/HSP70	66,8	+	+	+
Rv0440	Mb0448	groEL2	56,7	+	+	+
Rv0475	Mb0485	HbhA	21,5	+	-	+
Rv0577	Mb0592	TB27.3	27,3	+	-	-
Rv0652	Mb0671	L7/L12	13,4	+	+	+
Rv0667	Mb0686	RpoB	12,9	-	-	+
Rv0685	Mb0704	EF-Tu	43,5	+	+	+
Rv0733	Mb0754	Adk	20,0	+	-	+
Rv0831c	Mb0854c	Proteína conservada	30,2	+	+	+
Rv0934	Mb0959	PBP-1/PstS1	38,2	-	-	+
Rv1174c	Mb1207c	TB8.4	10,9	+	-	-
Rv1240	Mb1272	Mdh	34,3	-	-	+
Rv1352	Mb1387	Proteína conservada	12,8	+	-	-
Rv1411c	Mb1446c	LprG	24,5	+	-	+
Rv1626	Mb1652	Provável sistema regulador transcricional	22,7	-	-	+
Rv1827	Mb1858	GarA	17,2	+	+	-
Rv1860	Mb1891	MPT32	32,7	+	-	+
Rv1886c	Mb1918c	Antígeno 85B/MPT59	34,5	+	-	+
Rv1908c	Mb1943c	KatG	80,6	-	-	+
Rv1926c	Mb1961c	MPT63/MPB63	16,5	+	+	+
Rv1932	Mb1967	Tpx/CFP20	16,9	+	-	+
Rv1980c	Mb2002c	MPT64/MPB64	24,8	+	+	+
Rv1984c	Mb2006c	CFP21	21,8	+	-	+
Rv2031c	Mb2057c	HspX	16,2	+	+	+
Rv2220	Mb2244	GlnA1	53,5	+	-	+
Rv2461c	Mb2488c	CLP endopeptidase	21,7	-	-	+
Rv2626c	Mb2659c	Hrp1	15,5	+	+	-
Rv2744c	Mb2765c	Proteína conservada rica em alanina	29,2	-	-	+
Rv2787	Mb2810	Proteína conservada rica em alanina	63,8	+	-	-
Rv2873	Mb2898	MPT83/MPB83	22,0	+	+	+
Rv2875	Mb2900	MPT70/MPB70	19,0	+	+	+
Rv2878c	Mb2903c	MPT53	18,3	+	-	+
Rv2945c	Mb2970c	LppX	24,1	+	-	+
Rv3028c	Mb3054c	FixB	31,7	+	+	+
Rv3044	Mb3070	FecB	36,9	-	-	+
Rv3418c	Mb3452c	groES	10,8	+	+	+
Rv3804c	Mb3834c	Antígeno 85A/MPT44	35,7	+	-	+
Rv3841	Mb3871	BfrB	20,4	+	+	+
Rv3846	Mb3876	SodA	23,0	+	+	+
Rv3874	Mb3904	CFP10/ EsxB	10,8	+	+	+
Rv3875	Mb3905	ESAT-6	9,9	+	-	+
Rv3914	Mb3945	MPT46/TRX	12,5	+	-	+

FONTE: CHO, et. al, (2015), LEW, et. al, - TubercuList (2011)

NOTA: Antígenos T dependentes destacados por Cho, et al., (2015), identificados por espectrometria de massas em tuberculinas PPD bovinas do Reino Unido (PPD UK), Brasil (PPD BR) (BORSUK, et al., 2009) e Coréia do Sul (PPD KR) (CHO, et al., 2015). A presença do antígeno no proteoma de cada tuberculina está indicada por (+) e a ausência por (-).

Foram encontradas 33 proteínas em comum entre as três PPD de origens distintas, sendo 15 antígenos T dependentes (CHO, et al., 2015). Esses são ortólogos das proteínas: DnaK (Mb0358), GroEL2 (Mb0448), L7/L12 (Mb0671), EF-Tu (Mb0704), proteína conservada produto do gene Rv0831c (Mb0854c), MPT63/MPB63 (Mb1961c), MPT64/MPB64 (Mb2002c), HspX (Mb2057c), MPT83 (Mb2898), MPT70 (Mb2900), FixB (Mb3054c), GroES (Mb3452c), bacterioferritina BfrB (Mb3871), superóxido dismutase SodA (Mb3876), EsxB (Mb3904) (CHO, et al., 2015; LEW, et. al, 2011 - TubercuList).

As proteínas mais abundantes encontradas em PPD UK foram EsxB e Rv3418c, contra EF-Tu e Rv0865 na PPD BR. Em ambas, EF-Tu, DnaK, GroEL2, MPT83 e Rv2244 encontram-se de maneira abundante. O proteoma das tuberculinas PPD bovinas do Reino Unido e do Brasil apresenta as principais proteínas secretadas, como MPT32, MPT64, MPT83, MPT53, MPT70 e os componentes do antígeno 85 (BORSUK, et al., 2009).

Dentre as proteínas identificadas, a sua maioria representa proteínas citoplasmáticas (77,9%), e proteínas secretadas ou de membrana foram 22,4% do total (BORSUK, et al., 2009). As diferenças entre as PPD podem estar relacionadas a diferenças de cultivo das bactérias, métodos de esterilização, precipitação, fracionamento de peptídeos entre outras etapas de sua produção (CHO, et al., 2015).

### 2.5.1 Produção da tuberculina PPD bovina e controle por ensaio de potência biológica

As tuberculinas PPD bovinas são produzidas por todo o mundo a partir do cultivo de *M. bovis* AN5 (OIE, 2009; SCHILLER, 2010; BRASIL, 1994; BRASIL, 2006). As bactérias são inativadas por autoclavação, seguidas de filtração para separar a massa bacteriana do meio de cultivo. Então, é realizada a precipitação das proteínas presentes em nesse meio de cultura, que são purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos, gerando a denominada matéria prima, e posteriormente diluídas a uma concentração de 1 mg/ml, para o produto final (BRASIL, 1994; BRASIL, 2006).

No Brasil, as tuberculinas PPD bovinas devem estar de acordo com as normas da Portaria 64/1994 da Secretaria de Defesa Agropecuária, portanto devem passar por controle de qualidade, na fase de produto final. O controle de qualidade analisa parâmetros como a quantidade de fenol, o controle de nitrogênio, teste de esterilidade bacteriológica e fúngica, pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes e o teste de potência biológica (BRASIL, 1994).

O conteúdo proteico das tuberculinas não prevê sua atividade biológica, e podem existir diferenças consideráveis entre diferentes tuberculinas. Assim, cada lote de tuberculinas

deve ser testado quanto à sua potência (MONAGHAN, et al., 1994). A potência biológica das tuberculinas é estimada por métodos biológicos, sendo estes a comparação das tuberculinas com um padrão (OIE, 2009). No Brasil, esse padrão é fornecido pela Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO), do MAPA.

O ensaio de potência é realizado em cobaias previamente sensibilizadas com *M. bovis*. Faz-se a injeção intradérmica de 0,2 ml de diferentes diluições tanto do produto a ser examinado quanto de uma tuberculina padrão. São necessários, no mínimo, 6 animais para a realização dos testes, com peso de 400 a 600 g. Após 24h é feita a leitura do teste, avaliando a reação dos animais através da medida do diâmetro do eritema formado. A atividade relativa da tuberculina avaliada deve resultar em um valor entre 80 e 120% quando comparada ao padrão de referência (BRASIL, 1994; BRASIL, 2012).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO PROTEICA DAS AMOSTRAS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS

As matérias primas de tuberculinas PPD bovinas selecionadas foram provenientes da produção dos anos de 2014 e 2015 no Laboratório de Produção de Kits Diagnósticos (LPD), do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), unidade Juvevê. As tuberculinas foram preparadas a partir da inativação por autoclavação (100 °C, 3h) do cultivo de *M. bovis* AN5, sendo as proteínas concentradas através da precipitação por ácido tricloroacético. As matérias primas, diluídas a 1 mg/mL, foram submetidas ao teste de potência biológica pelo Controle de Qualidade, como parte da rotina do laboratório de produção.

Para os testes de padronização, foram utilizados 5 lotes de matéria prima da produção de 2015, com resultado satisfatório no teste de potência (MP011/15, MP012/15, MP013/15, MP014/15, MP015/15). Tais amostras foram quantificadas pelo método de biureto para proteínas totais, e adicionadas na proporção 1:1 a um *pool*.

Para os ensaios, foram selecionados quatro lotes que apresentaram resultado insatisfatório no ensaio de potência, e cinco que apresentaram resultado satisfatório. Essas amostras foram quantificadas pelo método de biureto para proteínas totais, tendo como padrão uma solução de albumina sérica bovina (BSA).

#### 3.2 SOROS DE COBAIAS

Treze cobaias utilizadas no ensaio de potência das tuberculinas PPD bovinas em produção, previamente sensibilizadas com inóculo de *M. bovis* de acordo com a legislação do MAPA, e três cobaias não sensibilizadas, tiveram seu sangue coletado por punção cardíaca ao final do ensaio de potência – imediatamente após sua eutanásia. A separação do soro do restante dos hemocomponentes foi feita através de centrifugação a 3.000 rpm, por 10 min. Após a centrifugação foi feito um *pool* dos soros das cobaias sensibilizadas, o qual foi utilizado como anticorpo primário nos ensaios de padronização, *western blot* e ELISA. Um *pool* de soros dos animais não sensibilizados foi utilizado como controle negativo no ELISA. Todo o procedimento aplicado aos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do TECPAR (Protocolo nº 001/15).

### 3.3 PADRONIZAÇÃO

Os parâmetros de eletroforese e *western blot*, como concentração de acrilamida/bisacrilamida, voltagem, amperagem e tempo de corrida, concentração de amostra, parâmetros de transferência, bloqueio e incubações com anticorpo primário e secundário foram baseados em dados da literatura (RENNIE; FILION; SMART, 2010; HAVLIR, et al., 1991; ROWLAND; RUCKERT; CUMMINGS, 1999; COLLINS; LAMB; YOUNG, 1988; BORSUK, et al., 2009; BECK, et al., 2005) e os testes de padronização foram realizados com um *pool* de amostras de matérias primas.

Para a determinação da concentração de amostra, anticorpo primário e secundário, um *dot blot* foi realizado em uma membrana de celulose, 0,45 µm (HAWP04700, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). O *pool* de amostras foi diluído a diferentes concentrações (2 mg/ml, 500 µg/ml, 15,6 µg/ml, 500 ng/ml, 15,6 ng/ml e 3,9 ng/ml), utilizadas para a sensibilização *overnight* da membrana. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão bloqueio (leite desnatado-PBS-*tween* 20) por 1h 30min em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com o *pool* de soros de cobaias sensibilizadas (1:50, 1:25 e 1:10) durante 2h, a 37 °C. A membrana foi, então, incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cobaia conjugado à peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em diferentes concentrações (1:1000 e 1:500), por 2h a 37 °C e revelada por diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além do *dot blot*, a concentração proteica foi testada em diferentes concentrações (2 mg/ml, 500 µg/ml e 500 ng/ml) em géis de eletroforese.

A concentração de acrilamida/bisacrilamida foi determinada pelo teste de diferentes concentrações (10, 12, 15, 18 e 20%), com gel *stacking* de 3%. Os parâmetros de corrida variaram de 80 a 100V, com 25 mA, e a corrida foi realizada até que a frente de corrida chegasse ao final do gel. Os parâmetros de transferência para membrana de PVDF tratada foram determinados após a padronização da eletroforese. A transferência foi feita a 25V, 300 mA, com diferentes durações (1h, 45 min e 30 min) e em seguida o *western blot* foi continuado com os parâmetros descritos em 3.4.

Para a padronização do ELISA, foram feitos testes com diferentes concentrações de *pool*, de 0,8 µg/ml a 0,0004 µg/ml, em diluição seriada (1:2) para a determinação da concentração de antígeno. Também foram testadas diferentes diluições de anticorpo primário (1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400) para a determinação da diluição utilizada no teste.

### 3.4 ELETROFORESE E WESTERN BLOT

Para a eletroforese, as amostras de PPD bovina selecionadas foram diluídas a uma concentração final de 2,0 mg/mL, adicionadas a tampão de amostra (Tris-HCl, SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol) e fervidas a 95 °C por 10 min. Em seguida, amostras e padrão de peso molecular (*BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram separados em um gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) 15%, a 100V, 25mA, utilizando tampão TRIS-glicina (pH 8,2). Após a eletroforese das amostras, o gel foi corado por azul de Coomassie.

Para o *western blot*, após a eletroforese das amostras, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF tratada, 0,45  $\mu$ m (*Immobilon-P*, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 25V, 300mA por 1h, com tampão TRIS-glicina-metanol. Após a transferência, a membrana foi incubada com tampão bloqueio (leite desnatado-PBS-*tween* 20) à temperatura ambiente por 2h, seguido de incubação com anticorpo primário (*pool* de soros de cobaias sensibilizadas) 1:10 por 1h30min a 37 °C. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cobaia conjugado à peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) 1:500, por 2h a 37 °C. A membrana foi revelada com DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os pesos moleculares das bandas encontradas foram determinados com o *software* LabImage 1D 2006 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

### 3.5 ELISA

Microplaca de ELISA de 96 poços foi sensibilizada com as amostras de matéria prima diluídas com tampão carbonato-bicarbonato a 0,2  $\mu$ g/ml, por 1h a 37 °C e *overnight* a 4 °C. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com tampão bloqueio (BSA, *tween* 20, PBS) por 2h e depois incubada com *pool* de soros de cobaias sensibilizadas com *M. bovis* ou *pool* de soros controle negativo, 1:6400 por 2h a 37 °C e a 4 °C *overnight*. Posteriormente, a placa foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cobaia conjugado à peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) 1:4000, por 1h30 a 37 °C. A placa foi revelada pela adição de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a reação foi bloqueada após 15 min com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura de absorbância foi feita em 492 nm,



pelo Epoch espectrofotômetro de microplaca (BioTek, Winooski, VT, EUA) com a utilização do *software* Gen5 2.03 (BioTek, Winooski, VT, EUA).

Os resultados foram analisados pelo GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., CA, USA), através de ANOVA de uma via, na comparação entre as diferentes matérias primas, seguido de um teste de Tukey de múltiplas comparações. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Além disso, os resultados de ensaio de potência foram analisados juntamente com os resultados de absorbância em busca de uma correlação entre os valores, por meio de correlação de Pearson.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMOSTRAS DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS SELECIONADAS E DETERMINAÇÃO PROTEICA

As amostras selecionadas de matéria prima das tuberculinas bovinas, os respectivos resultados no ensaio de potência e a concentração de proteínas totais estão listados na TABELA 4. Foram consideradas como amostras de alta potência as MP 003/14, 004/14, 001/15, 002/15 e 004/15, e, como de baixa potência, as MP 005/14, 005/14 Q, 006/14 e 007/14.

TABELA 4 – AMOSTRAS DE MATÉRIA-PRIMA SELECIONADAS, POTÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO

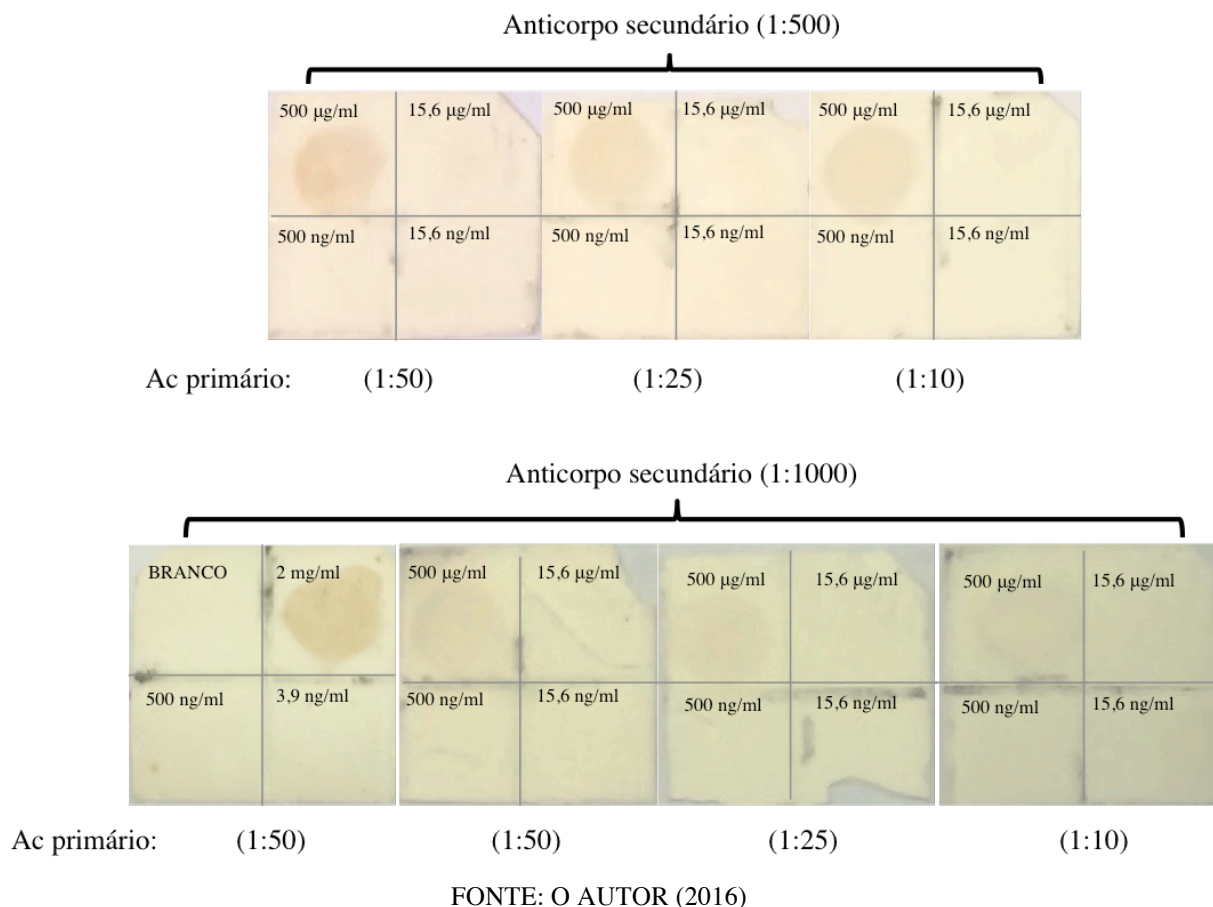
Amostra	Potência a 1 mg/mL	Quantificação proteica (mg/ml)
MP003/14	76,5%	27,97
MP004/14	82,4%	29,83
MP005/14	27%	26,61
MP005/14 Q	3,5%	37,45
MP006/14	9,6%	31,69
MP007/14	24,5%	30,17
MP001/15	128,9%	24,24
MP002/15	127%	23,22
MP004/15	109%	23,05

FONTES: O AUTOR (2016)

NOTA: Amostras de matéria-prima selecionadas, com seus respectivos resultados no ensaio de potência e quantificação proteica, feita pelo método do Biureto para proteínas totais, utilizando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

### 4.2 PADRONIZAÇÃO

Os testes de *dot blot* (FIGURA 6) mostraram revelação apenas na sensibilização com concentrações de 2 mg/ml e 500 µg/ml do *pool* de amostra. Quando comparadas entre si, a revelação das membranas incubadas com diferentes diluições de anticorpo primário (1:10, 1:25 e 1:50) não mostrou diferença aparente, sendo 1:10 a diluição de anticorpo escolhida. Já nos parâmetros de anticorpo secundário, as membranas incubadas com diluição de 1:1000 tiveram uma revelação mais fraca, quando comparadas à diluição de 1:500 do anticorpo. Assim, a diluição de anticorpo secundário selecionada foi 1:500.

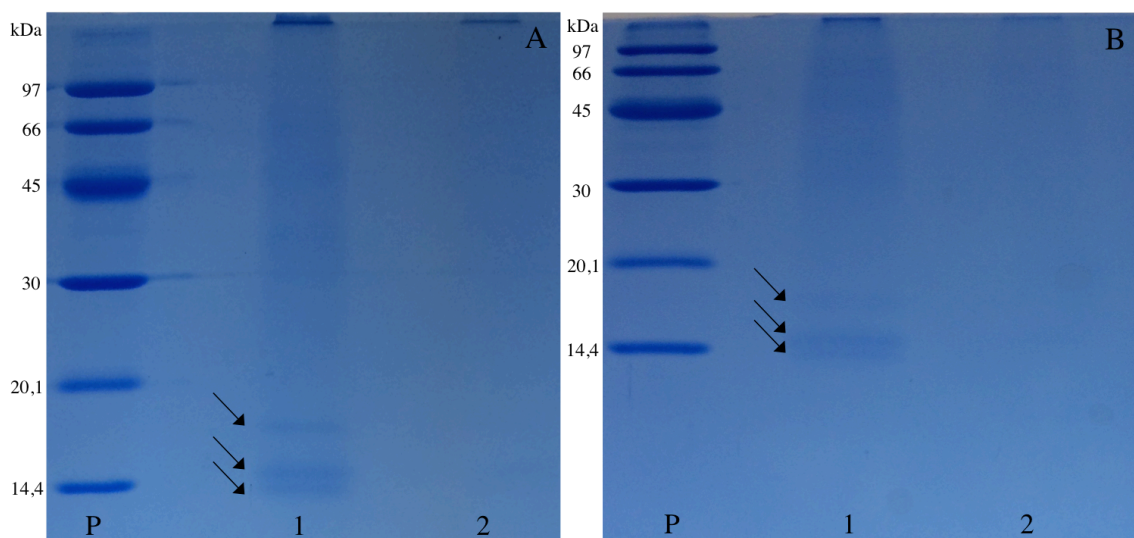
FIGURA 6 – RESULTADOS DE *DOT BLOT*

NOTA: Resultados de *dot blot* de testes feitos em uma membrana de celulose, com diferentes concentrações de antígeno (2 mg/ml, 500 µg/ml, 15,6 µg/ml, 500 ng/ml, 15,6 ng/ml e 3,9 ng/ml) indicadas em cada quadrante; diferentes concentrações de anticorpo primário (1:50, 1:25 e 1:10), indicadas abaixo de cada teste, composto de 4 quadrantes, e diferentes concentrações de anticorpo secundário (1:500, 1:1000), indicadas acima de cada teste.

Nos testes de padronização de eletroforese, todos os géis de diferentes concentrações de acrilamida/bisacrilamida (10, 12, 15, 18 e 20%) exibiram a amostra na concentração de 2 mg/ml, e alguns géis também mostraram a amostra na concentração de 500 µg/ml, de maneira menos evidente. A partir dessas observações e dos dados do *dot blot*, a concentração de 2 mg/ml foi selecionada.

Em todos os géis de diferentes concentrações observa-se um rastro de proteínas. Observou-se que à medida que a concentração do gel aumenta, o rastro de proteínas mostra uma maior separação na região de baixo peso molecular. Entretanto, a partir de 18% a concentração de acrilamida/bisacrilamida mostrou-se muito alta, já que fazia com que as proteínas ficassem aglomeradas no começo do gel (dados não mostrados). Nos géis de 15 e 18% evidenciaram-se três bandas na região de baixo peso molecular, entre 20,1 e 14,4 kDa (FIGURA 7). Pela melhor separação dessas bandas ocorrer em gel de 15%, essa foi a concentração de acrilamida/bisacrilamida selecionada.

FIGURA 7 – GÉIS DE PADRONIZAÇÃO

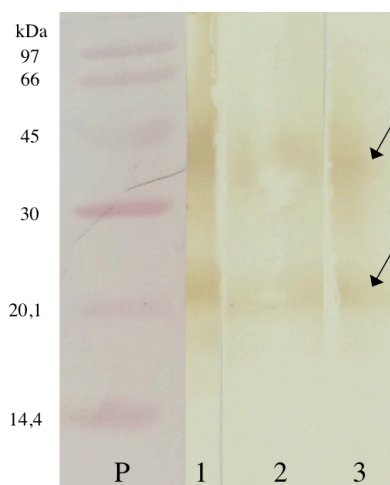


FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: (A) Gel de acrilamida/bisacrilamida 15% mostrando bandas definidas na região de baixo peso molecular. (B) Gel de acrilamida/bisacrilamida 18% mostrando bandas na região de baixo peso molecular (setas). (P) Padrão de peso molecular. (1) *Pool* de matérias primas na concentração de 2 mg/ml. (2) *Pool* de matérias primas na concentração de 500 µg/ml. A concentração de 500 ng/ml não é representada pois não houve rastro aparente.

As diferentes voltagens de corrida não influenciaram na corrida das amostras, exceto pelo tempo que a frente de corrida alcançava o final do gel. A voltagem de 100V foi escolhida por ser nela que a corrida terminava em um menor tempo. Nos testes de tempo de transferência, o *western blot* (FIGURA 8) mostrou uma melhor revelação na membrana que sofreu transferência durante 1h, sendo esse o parâmetro de transferência escolhido.

FIGURA 8 – RESULTADOS DE WESTERN BLOT EM DIFERENTES TEMPOS DE TRANSFERÊNCIA

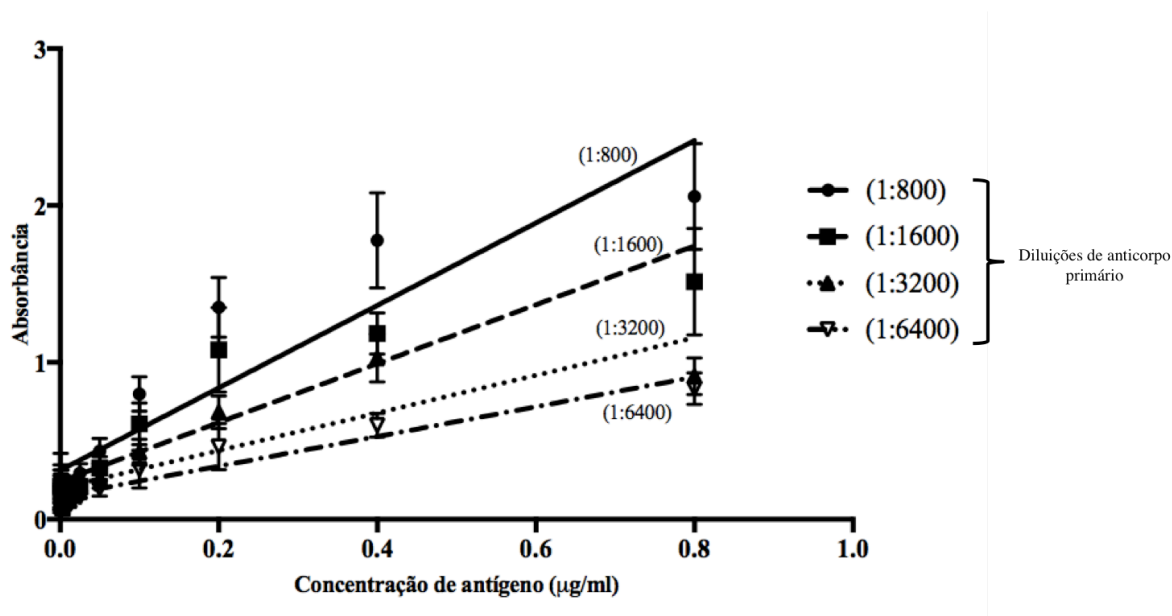


FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: (P) Padrão de peso molecular. Revelação após transferência de 1h (1), 45 min (2) e 30 min (3). Bandas aproximadas estão indicadas por setas.

Na padronização do ELISA, as diferentes diluições de antígeno e anticorpo geraram curvas-padrão (absorbância x concentração), demonstradas na FIGURA 9. A partir dessas curvas, foram escolhidas as concentrações de amostra e anticorpo primário. A concentração de 0,2 µg/ml de antígeno foi selecionada por estar na parte central da curva, garantindo que as leituras de absorbância derivadas das matérias primas se encaixem na sua linearidade. A diluição de anticorpo foi escolhida baseando-se na melhor curva padrão gerada a partir da regressão linear de diferentes concentrações de antígeno. O  $R^2$  foi (1:800): 0,8617; (1:1600): 0,8516; (1:3200): 0,7609 e (1:6400): 0,929. Assim, foi escolhida a diluição de anticorpo primário de 1:6400 pois essa demonstrou  $R^2$  mais próximo a 1.

FIGURA 9 – CURVAS-PADRÃO DOS ENSAIOS DE PADRONIZAÇÃO DE ELISA



FONTE: O AUTOR (2016)

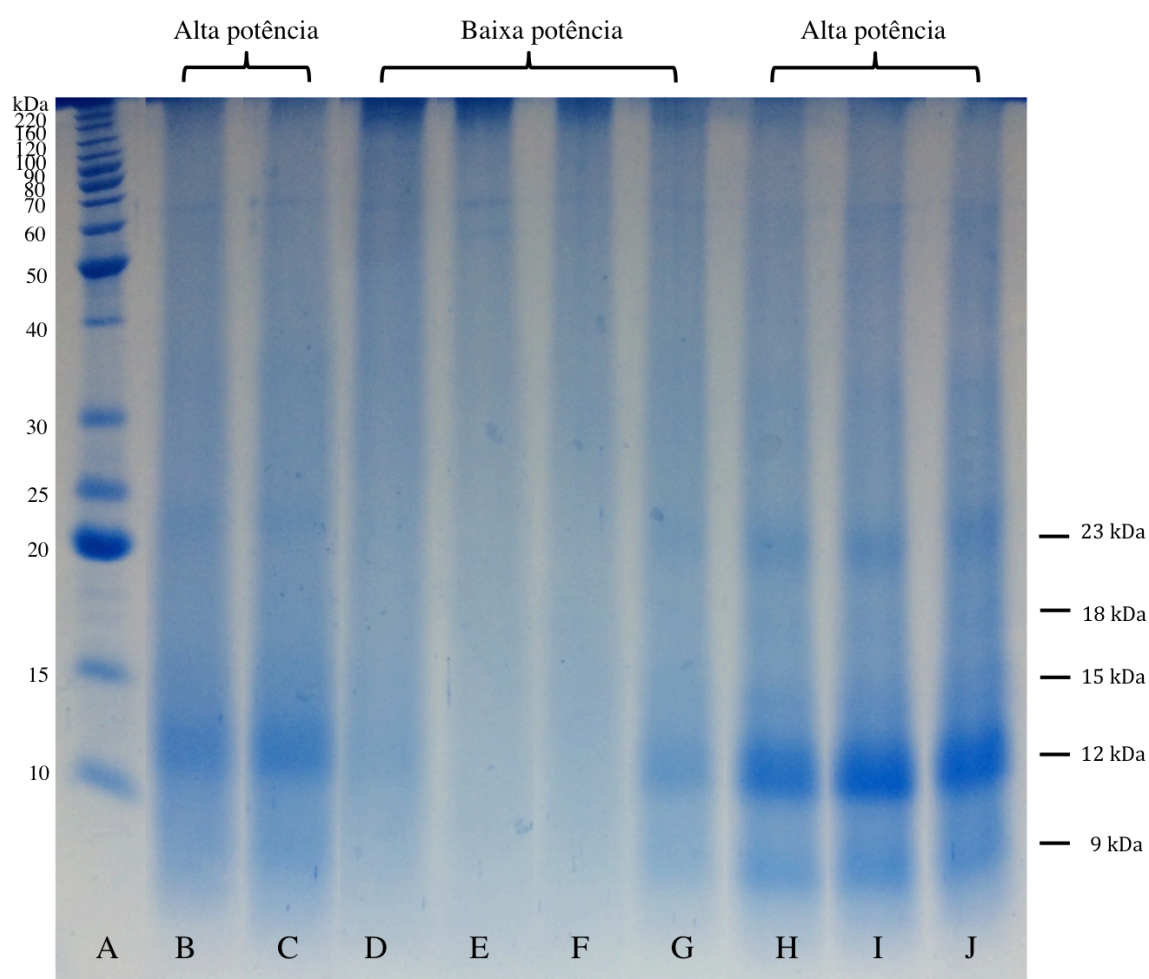
NOTA: Curvas-padrão determinadas a partir de diferentes diluições de antígeno e de anticorpo primário (*pool* soro positivo derivado de cobaias previamente sensibilizadas por *M. bovis*). Os pontos preenchidos representam a curva de diluição de anticorpo (1:800); os quadrados preenchidos representam (1:1600); o triângulo preenchido representa (1:3200); e o triângulo invertido vazado representa (1:6400). As linhas representam a regressão linear correspondente à cada curva padrão, com resultados de  $R^2$  de (1:800): 0,8617; (1:1600): 0,8516; (1:3200): 0,7609 e (1:6400): 0,929.

#### 4.3 ELETROFORESE

O perfil de eletroforese, tanto das tuberculinas de potência satisfatória quanto das insatisfatórias, apresentou-se como um rastro de proteínas, em toda a extensão do gel (FIGURA 10). As tuberculinas de alta potência apresentaram cinco bandas mais evidentes, de

aproximadamente 9, 12, 15, 18 e 23 kDa. As tuberculinas de alta potência de 2015 (MP001, MP002, MP004) apresentaram essas bandas de maneira mais evidente se comparadas às tuberculinas de alta potência de 2014 (MP003, MP004). As tuberculinas de baixa potência apresentaram bandas menos evidentes. A MP005/14 apresentou apenas a banda de 12 kDa, enquanto a MP007/14 apresentou bandas de 12, 15 e 23 kDa. Ainda, MP005/14 Q e MP006/14 não apresentaram bandas aparentes, com um enfraquecimento do rastro de proteínas na altura de 25 kDa.

FIGURA 10 – PERFIL DE ELETROFORESE DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS



FONTE: O AUTOR (2016)

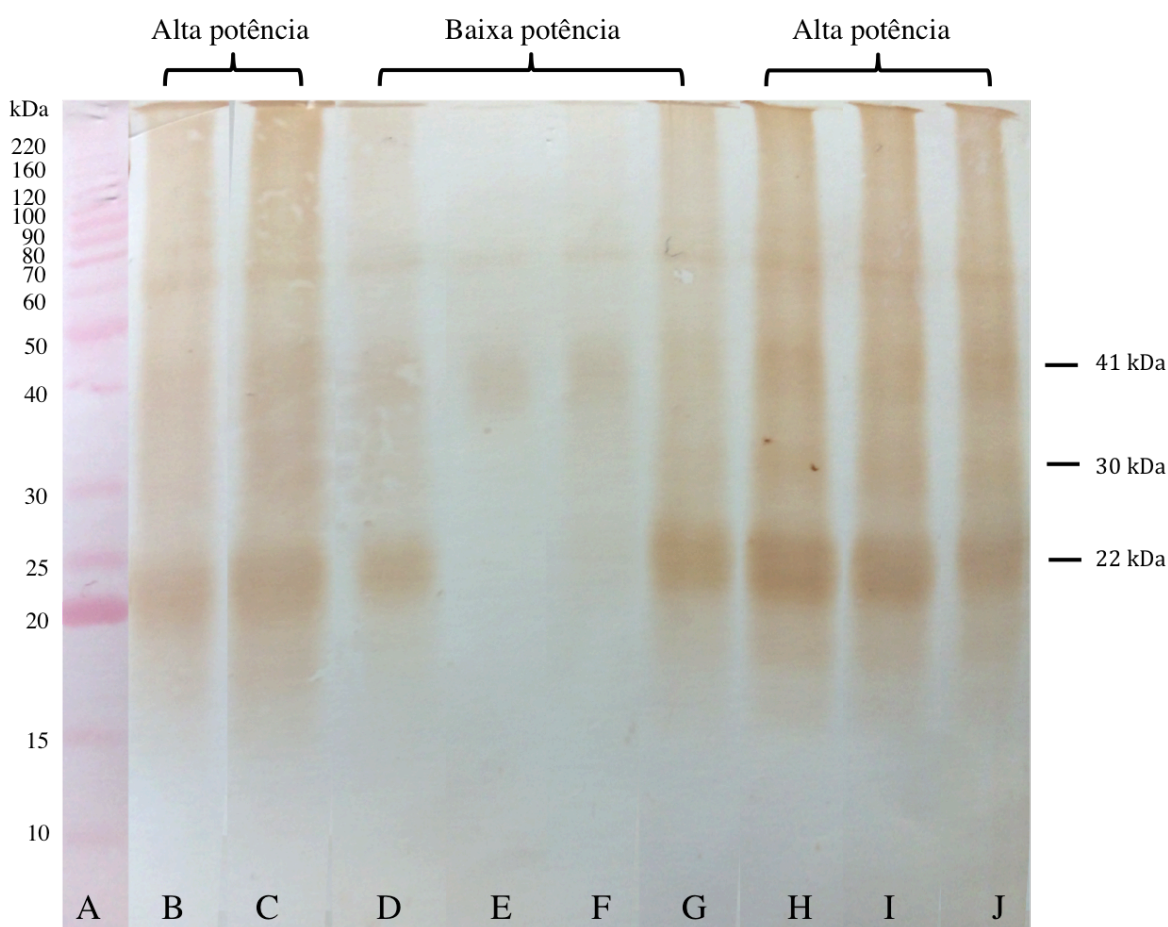
NOTA: Perfil corado por azul de Coomassie. (A) Padrão de peso molecular. Amostras de tuberculinas das matérias primas MP003/14 (B), MP004/14 (C), MP005/14 (D), MP005/14 Q (E), MP006/14 (F), MP007/14 (G), MP001/15 (H), MP002/15 (I) e MP004/15 (J).



#### 4.4 WESTERN BLOT

O perfil de *western blot* das tuberculinas de alta e baixa potência apresentou-se como um rastro de 220 a 15 kDa (FIGURA 11). Nas tuberculinas de alta potência evidenciaram-se três bandas principais de aproximadamente 22, 30 e 41 kDa. Todas as tuberculinas, inclusive as de baixa potência, apresentaram a banda de 41 kDa. A banda de 30 kDa foi bem evidente nas tuberculinas de alta potência, principalmente nas do ano de 2015 (MP001, MP002 e MP004), mas também apareceu em duas tuberculinas de baixa potência (MP005/14 e MP007/14). Já a banda de 22 kDa se mostrou presente em todas as tuberculinas de alta potência, e em apenas duas tuberculinas de baixa potência (MP005/14 e MP007/14). Ainda, as tuberculinas de baixa potência têm seu rastro aparentemente mais fraco do que o presente nas tuberculinas de alta potência.

FIGURA 11 – PERFIL DE *WESTERN BLOT* DE TUBERCULINAS PPD BOVINAS



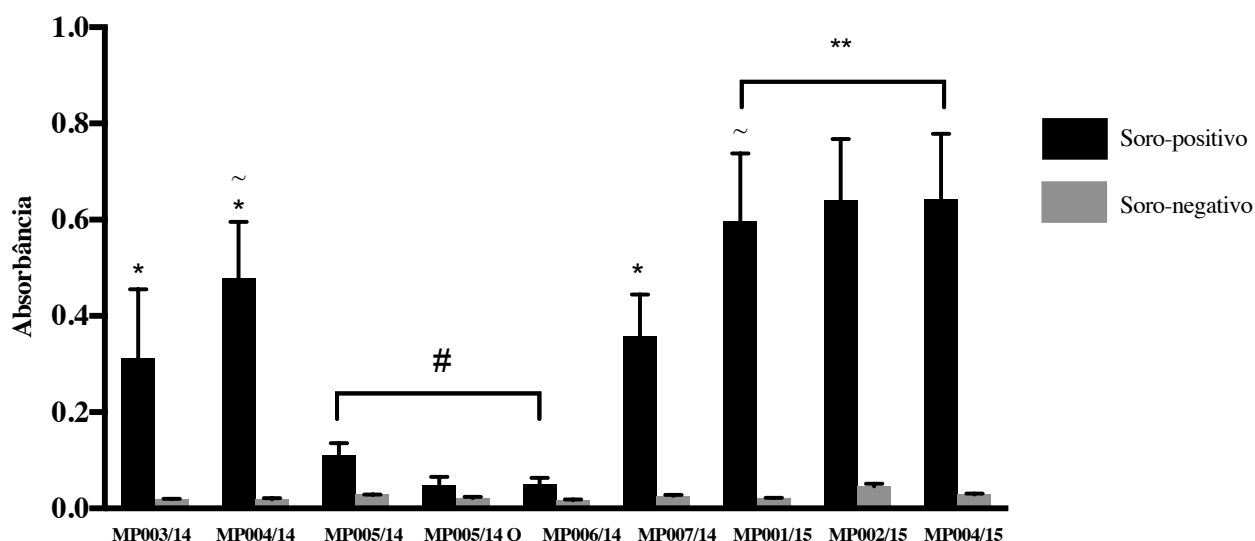
FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: Perfil revelado por Ponceaus (padrão molecular) e DAB. (A) Padrão de peso molecular. Amostras de tuberculinas das matérias primas MP003/14 (B), MP004/14 (C), MP005/14 (D), MP005/14 Q (E), MP006/14 (F), MP007/14 (G), MP001/15 (H), MP002/15 (I) e MP004/15 (J).

#### 4.5 ELISA

As diferentes matérias primas, assim como na eletroforese e *western blot*, apresentaram diferença significativa entre as médias de absorvância ( $p < 0,05$ ), o que representa o reconhecimento pelos anticorpos primários derivados do soro de cobaias sensibilizadas por *M. bovis*. As matérias primas de alta potência (MP003/14, MP004/14, MP001/15, MP002/15 e MP004/15) apresentam um maior reconhecimento pelos anticorpos do que as matérias primas de baixa potência (MP005/14, MP005/14 Q, MP006/14 e MP007/14) (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ABSORBÂNCIA DE MATÉRIAS PRIMAS



FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: Médias de absorvância de diferentes matérias primas (0,2 µg/ml), incubadas com anticorpo primário soro positivo ou soro negativo. Símbolos iguais significam que não há diferença significativa entre os grupos.

As matérias primas de baixa potência MP005/14 Q e MP006/14 apresentaram o menor reconhecimento, com média de absorvância de  $0,048 \pm 0,017$  e  $0,050 \pm 0,013$ , respectivamente. MP005/14 e MP007/14 apresentaram um reconhecimento maior do que MP005/14 Q e MP006/14 ( $0,111 \pm 0,025$  e  $0,359 \pm 0,086$ , respectivamente). As matérias primas de alta potência apresentaram maior reconhecimento, sendo as matérias primas de 2015 mais reconhecidas (MP003/14:  $0,312 \pm 0,143$ ; MP004/14:  $0,478 \pm 0,117$ ; MP001/15:  $0,597 \pm 0,140$ ; MP002/15:  $0,640 \pm 0,127$ ; MP004/15:  $0,643 \pm 0,135$ ).

O controle negativo foi feito pela incubação com soro de animais não sensibilizados por *M. bovis* (soro negativo). Os resultados de absorvância das amostras de matéria prima de



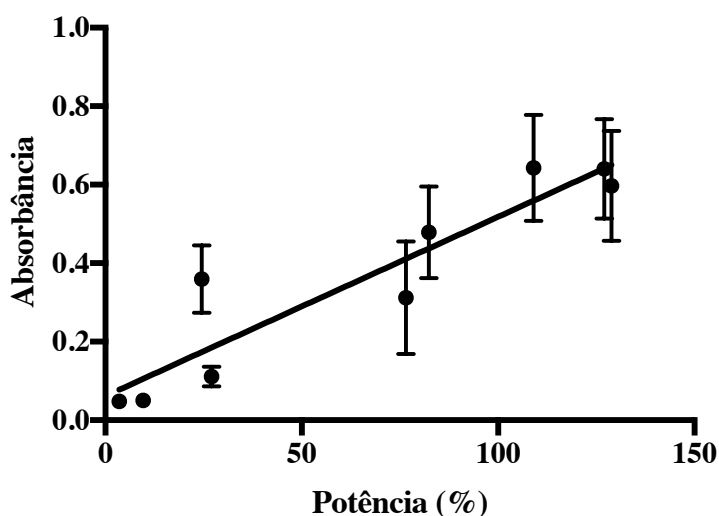
baixa potência, com exceção da MP007/14, não foram diferentes da absorbância na presença de soro negativo ( $p>0,05$ ). Já MP003/14, MP004/14, MP007/14, MP001/15, MP002/15 e MP004/15 apresentaram diferença na absorbância entre soro positivo e negativo ( $p<0,05$ ).

As matérias primas de baixa potência MP005/14, MP005/14 Q e MP006/14 não apresentaram diferença quando comparadas, em pares, entre si ( $p>0,05$ ). Entretanto, a matéria prima MP007/14 apresentou diferença ( $p<0,05$ ) quando comparada, em pares, com as outras três matérias primas de baixa potência. No mesmo padrão, as amostras de matéria-prima de alta potência do ano de 2015 (MP001/15, MP002/15 e MP004/15) não apresentaram diferença quando comparadas entre si ( $p>0,05$ ). Já as matérias primas de alta potência de 2014 (MP003/14 e MP004/14) apresentaram diferença de absorbância quando comparadas entre si ( $p<0,05$ ).

Observou-se que todas as matérias primas de alta potência apresentaram diferença de absorbância quando comparadas às matérias primas de baixa potência, com exceção de MP007/14, que não difere das matérias primas MP003/14 e MP004/14. Quando se comparam as matérias primas de alta potência, as matérias primas de 2015 são significativamente diferentes das matérias primas de 2014, com exceção de MP004/14 e MP001/15 ( $p>0,05$ ).

Correlacionando-se os resultados do ensaio de potência com resultados de absorbância, percebe-se uma correlação positiva ( $r = 0,9306$ ;  $p<0,05$ ) sendo que quanto maior a potência, maior a absorbância observada no ELISA (FIGURA 13).

FIGURA 13 – CORRELAÇÃO ENTRE POTÊNCIA E ABSORBÂNCIA



FONTE: O AUTOR (2016)

## 5 DISCUSSÃO

Embora amplamente utilizada para o diagnóstico, pouco se sabe sobre a composição da PPD bovina (BORSUK, et al., 2009) e quais proteínas são responsáveis pela imunogenicidade desses antígenos de composição complexa. A desnaturação de proteínas que ocorre durante o processo de produção dificulta a caracterização dos antígenos presentes na PPD (BORSUK, et al., 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010). Rennie, Filion e Smart (2010) demonstraram que as tuberculinas PPD bovinas são uma mistura de diversos fragmentos de peptídeos. Isso se traduz na aparição de um rastro de proteínas em análises de SDS-PAGE (RENNIE; FILION; SMART, 2010), como evidenciado em estudos feitos por Klausen, et al. (1994) e Rowland, Ruckert e Cummings (1999) com PPD proveniente de *M. tuberculosis*, e BORSUK, et al. (2009), com PPD bovina e aviária (KLAUSEN, et. al, 1994; ROWLAND; RUCKERT; CUMMINGS, 1999; BORSUK, et al., 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010). Corroborando com esses estudos, no presente estudo os perfis de eletroforese das tuberculinas PPD bovinas apresentaram-se como um rastro de proteínas, indicando que seus antígenos encontram-se fragmentados (KLAUSEN, et. al, 1994; ROWLAND; RUCKERT; CUMMINGS, 1999; BORSUK, et al., 2009; RENNIE; FILION; SMART, 2010).

Nos perfis de eletroforese de tuberculinas de potência satisfatória é possível observar cinco bandas mais evidentes, de aproximadamente 9, 12, 15, 18 e 23 kDa. Isso também foi observado por Rennie, Filion e Smart (2010), na forma de duas bandas mais evidentes, em aproximadamente 10 e 23 kDa (RENNIE; FILION; SMART, 2010). A ausência ou enfraquecimento das bandas/rastro de proteínas na região de baixo peso molecular em matérias primas de baixa potência indica que estas proteínas seriam importantes na imunogenicidade das tuberculinas. Gupta, Ram e Bansal (1994) demonstraram que uma fração proteica de 23,5 a 12,5 kDa, proveniente do filtrado de cultura de *M. bovis*, apresentou a maior imunogenicidade dentre todas as frações (GUPTA; RAM; BANSAL, 1994). A presença do rastro de proteínas/bandas abaixo de 25 kDa nas tuberculinas de baixa potência, correlaciona-se a uma potência maior do que a potência de amostras que têm seu rastro de proteínas diminuído abaixo de 25 kDa – 27 e 25,5% contra 3,5 e 9,5%, respectivamente, o que evidencia a importância das proteínas de baixo peso molecular na imunogenicidade das tuberculinas PPD bovinas.

A análise dos perfis de *western blot* das tuberculinas PPD bovinas de alta potência apresentou um rastro de proteínas similar ao da eletroforese. Klausen et al. (1994), também

observaram um rastro ou bandas difusas no *western blot* de PPD proveniente de *M. tuberculosis*, utilizando anticorpos monoclonais anti-PPD (KLAUSEN, et. al, 1994). No presente estudo pôde-se evidenciar três bandas principais, de aproximadamente 22, 30 e 41 kDa. Um padrão parecido foi visto no estudo de Rennie, Filion e Smart (2010), com uma forte banda em 22 kDa e duas bandas mais fracas de aproximadamente 40 e 66 kDa (RENNIE; FILION; SMART, 2010). Cataldi, Romano e Bigi (1994) relataram três bandas, de 23, 33 e 14 kDa sendo mais frequentemente reconhecidas em *western blot* do sobrenadante de cultura de *M. bovis* AN5, e estimam que a banda de 23 kDa seja a mais antigênica delas (CATALDI; ROMANO; BIGI, 1994). Já no estudo de Bardarov, et al. (1990) utilizando soro policlonal anti-PPD, o *western blot* mostrou um rastro de proteínas de no máximo 14 kDa (BARDAROV, et al., 1990).

A intensidade da banda de 22 kDa no *western blot*, juntamente com sua ausência/menor intensidade nas matérias primas de baixa potência, indica que esta pode ter uma grande imunogenicidade na resposta do tipo tardio do ensaio de potência. A banda de 30 kDa aparece enfraquecida em matérias primas de baixa potência, indicando que essa também pode ter algum papel na imunogenicidade. Já a banda de 41 kDa, aparente em todas as amostras, parece não ser tão importante para imunogenicidade da PPD. Comparando-se os perfis de eletroforese e *western blot*, encontraram-se bandas de peso molecular correspondentes (23 e 22 kDa, respectivamente). Possivelmente pode-se tratar da mesma proteína, que por sua intensidade e presença tanto na eletroforese, quanto no *western blot*, aparenta ser a mais importante para a imunogenicidade da PPD.

O ELISA permitiu quantificar possíveis diferenças de reconhecimento por anticorpos nas diferentes matérias primas, uma vez que há uma aparente relação entre o resultado de absorbância no teste e a potência das amostras. As matérias primas de alta potência (MP003/14, MP004/14, MP001/15, MP002/15 e MP004/15) apresentaram resultados significativamente maiores de absorbância quando comparadas às matérias primas de baixa potência, com exceção de MP007/14, que não difere significativamente de MP003/14 e MP004/14. As amostras de 2015, que apresentaram as bandas de eletroforese e *western blot* de maneira mais evidente, tiveram resultados significativamente superiores às amostras de 2014.

Dentre as amostras de baixa potência, MP005/14 Q e MP006/14, que não apresentaram bandas de baixo peso molecular e apresentaram enfraquecimento do rastro proteico nessa região foram as que apresentaram o menor reconhecimento. MP005/14, que apresentou apenas a banda de 12 kDa na eletroforese, apresentou reconhecimento superior,

mesmo que não significativamente diferente, à MP005/14 Q e MP006/14. Já MP007/14, que apresentou bandas de 12, 15 e 23 kDa, teve resultado de absorbância significativamente superior aos resultados de MP005/14, MP005/14 Q e MP006/14, mas que não difere do resultado das matérias primas de alta potência MP003/14 e MP004/14. Esses dados corroboram a ideia de que a presença de proteínas representadas por bandas, principalmente as de baixo peso molecular, são importantes para a reação do teste tuberculínico e a potência das amostras.

Ainda, foi possível correlacionar a potência das matérias-primas com a absorbância obtida pelo ensaio imunoenzimático. Quanto maior a potência maior é a resposta dos anticorpos frente às tuberculinas, o que demonstra uma correlação entre os dois testes. Assim, o ELISA poderia ser utilizado na complementação de testes de qualidade na produção das tuberculinas PPDs bovinas, e futuramente pode tornar-se uma alternativa ao teste de potência. Essa correlação pode, ou não, ser ocasionada pela resposta imune aos mesmos antígenos presentes nas tuberculinas, já que a resposta de potência é uma resposta celular de hipersensibilidade do tipo IV, incitada por antígenos de células T e o reconhecimento por anticorpos requer antígenos de células B.

Analisando o proteoma de tuberculinas PPD bovinas, descrito por Borsuk, et al. (2009) e Cho, et al. (2015), e considerando que a presença de bandas parece ser um fator importante para a imunogenicidade das tuberculinas, pode-se inferir a identidade das bandas proteicas encontradas nos ensaios de eletroforese e *western blot*, listadas na TABELA 5.

Rennie, Filion e Smart (2010), analisaram pontos de eletroforese 2D de filtrado de cultura de *M. bovis* por espectrometria de massas, indicando que as proteínas de 22 kDa encontradas sejam possivelmente MPB83 ou MPB70. Ainda, segundo os autores, bandas de maior peso molecular, como a banda de 41 kDa, poderiam representar dímeros ou trímeros de MPB70 e MPB83 (RENNIE; FILION; SMART, 2010).

TABELA 5 – POSSÍVEIS IDENTIDADES DE BANDAS DE ELETROFORESE E WESTERN BLOT

<b>Bandas de eletroforese e western blot</b>	<b>Possíveis proteínas correspondentes</b>
9, 12, 15 kDa	CFP-10 (11 kDa), ESAT-6 (10 kDa), GroEs (11 kDa), proteína ribossomal L7/L12 (13 kDa), Hsp $\alpha$ (16 kDa), RpoB (13 kDa), TB8.4 (11 kDa), Rv1352 (12,8 kDa), MPT63/MPB63 (16,5 kDa), Hrp1 (15,5 kDa), TRX/MPT46 (12,5 kDa)
18 e 22/23 kDa	MPT64 (22 kDa), P21 (22 kDa), MPT83 (22 kDa), MPT70 (19 kDa), MPT53 (18 kDa), GarA (17,2 kDa), CFP20 (17 kDa), CFP22 (19,2 kDa), HbhA (21,5 kDa), Adk (20 kDa), LprG (24,5 kDa), CLP endopeptidase (21,7 kDa), LppX (24,1 kDa), BrfB (20,4 kDa), SodA (23 kDa)
30 kDa	Ag 84 (28 kDa), MTB32a (35 kDa), TB27.3 (27,3 kDa), Rv0831c (30,2 kDa) e Rv2744c (29,2 kDa), Mdh (34,3 kDa), MPT32 (33 kDa), FixB (31,7 kDa), Ag 85A (32 kDa), Ag 85B (34,5 kDa),
41 kDa	EF-Tu (44 kDa), serina hidroximetiltransferase (45 kDa), S-adenosil metionina sintase (43 kDa), transaldolase (41 kDa), acetil-CoA C-acetiltransferase (46 kDa), $\beta$ -cetoacil-ACP sintase (46 kDa), subunidade alfa da RNA polimerase (38 kDa)

FONTE: BORSUK, et al. (2009), CHO, et al. (2015)

NOTA: A tabela lista as possíveis proteínas correspondentes às bandas encontradas nos ensaios de eletroforese e *western blot* baseando-se nas proteínas descritas como antígenos T dependentes, por Cho, et al. (2015), de peso molecular semelhante ao das bandas encontradas. Esses antígenos foram identificadas dentre as proteínas descritas por Borsuk, et al., (2009) e Cho, et al. (2015).

CFP-10 é uma proteína secretada, parte da denominada família ESAT-6 (SKJOT, et al., 2000). Está presente em filtrados de cultura de baixo peso molecular, e foi caracterizada por Berthet et al. (1998), em *M. tuberculosis* (BERTHET et al., 1998). CFP-10 mostra-se imunogênica já que induz a produção de grandes níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes infectados por tuberculose, incitando uma resposta de células T similar à resposta incitada por ESAT-6 (SKJOT, et al., 2000). ESAT-6 é um antígeno secretado, imunodominante no começo da infecção por *M. bovis* em bovinos, sendo o principal alvo de células T na fração de antígenos de baixo peso molecular (POLLOCK; ANDERSEN, 1997). ESAT-6 induz níveis de IFN- $\gamma$  similares aos ocasionados por PPD bovina (BUDDLE, et al., 1999). No estudo de Pollock, et al. (2000) se mostra mais específico que a PPD bovina para o diagnóstico da tuberculose (POLLOCK, et al., 2000), podendo diferenciar bovinos infectados de bovinos vacinados (BUDDLE, et al., 1999).

Alito, et al. (2003), identificaram CFP-10, ESAT-6 e MPB70 em meio a proteínas presentes nas frações mais imunogênicas de sobrenadantes de cultura de *M. bovis* AN5, em cultivo de 24 e 38 dias. Ainda, nesse mesmo estudo, L7/L12 foi identificada dentre as proteínas do extrato celular de *M. bovis* que apresentaram grande reatividade por células T (ALITO, et al., 2003). Ainda, as proteínas ribossomais L7 e L12 também foram encontradas

em PPD de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG, e sua mistura (L7/L12) incitou uma forte resposta de hipersensibilidade do tipo IV (KITAURA; KINOMOTO; YAMADA, 1999).

Os antígenos do complexo Ag85 são encontrados em filtrados de cultura, (RENNIE; FILION; SMART, 2010), e induzem uma forte resposta Th1 (HUYGEN, 2014). MPB70 e MPB83 são duas proteínas que apresentam sequências distintas, porém com grande homologia (HARBOE, et al., 1995). MPB70 é um antígeno secretado, caracterizado por Nagai, Matsumoto e Nagasuga (1981), quando apresentou especificidade imunológica para *M. bovis* (NAGAI; MATSUMOTO; NAGASUGA, 1981). Em um estudo de Vordemeier, et al. (1999), tanto MPB70 quanto MPB83 induziram proliferação de linfócitos provenientes de animais infectados (VORDERMEIER, et al., 1999). Ainda, MPB64 é capaz de incitar uma reação de hipersensibilidade tardia em animais sensibilizados por *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*, de maneira mais potente que a PPD (HAGA, et. al, 1995). Vacinas de DNA expressando MPT64 e antígeno 85B estimulam respostas de células TCD4+ e TCD8+ (KAMATH, et al., 1999).

A identidade exata das bandas só pode ser determinada através da extração proteica e subsequente proteômica. É importante ressaltar que as bandas apresentadas na eletroforese e *western blot* podem representar um fragmento de antígeno presente na tuberculina, ao invés de uma proteína íntegra. Embora proteínas secretadas tenham sido descritas como antígenos de células T, importantes para a patogênese de *Mycobacterium* (POLLOCK; ANDERSEN, 1997; SKJOT, et al., 2000; VORDERMEIER, et al., 1999; ROOK, et al., 1986; HORWITZ, et al., 1995), as proteínas encontradas poderiam, também, representar proteínas citoplasmáticas, já que essas são a maioria das proteínas encontradas no proteoma da PPD (BORSUK, et al., 2009).

## 6 CONCLUSÃO

As amostras de matéria prima de tuberculinas PPD bovinas tiveram seu conteúdo proteico devidamente determinado, através do método de biureto para proteínas totais. Ainda, os métodos de eletroforese, *western blot* e ELISA tiveram seus parâmetros devidamente padronizados para a análise e caracterização proteica das tuberculinas PPD bovinas.

A caracterização do perfil de eletroforese e *western blot* de tuberculinas PPD bovinas foi bem sucedida. O perfil de eletroforese apresentou um rastro proteico, evidenciando-se 5 bandas principais. Já o perfil de *western blot*, além de um rastro proteico mostrou reconhecimento de 3 bandas principais.

A comparação entre as tuberculinas de diferentes potências mostrou uma diferença no reconhecimento por anticorpos desses dois grupos, no ELISA, e também uma diferença no perfil proteico, na eletroforese e *western blot*. Certas bandas proteicas, menores de 30 kDa, aparentaram ser as mais importantes para a reação do teste tuberculínico, sendo assim, prováveis imunogênicas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo investigar a composição de matérias primas de tuberculinas PPD bovinas produzidas no Instituto de Tecnologia do Paraná, TECPAR, nos anos de 2014 e 2015 através de *western blot* e ELISA.

A maioria dos estudos presentes na bibliografia avaliam a composição antigênica de *Mycobacterium* spp. através da análise de filtrados de cultura ou sobrenadantes de cultura da micobactéria. O presente estudo acrescenta uma caracterização por eletroforese e *western blot* aos escassos estudos feitos acerca da caracterização de tuberculinas PPD bovinas, e diferencia-se dos demais estudos pela utilização de tuberculinas de diferentes potências biológicas, possibilitando sua comparação e a identificação de proteínas importantes para a reação de hipersensibilidade ocasionada por essa mistura complexa de antígenos.

A partir dos resultados de eletroforese e *western blot*, prováveis proteínas imunogênicas poderiam ser isoladas e identificadas, podendo, futuramente, ser utilizadas em testes mais específicos para o diagnóstico da tuberculose bovina. Além disso, a padronização de métodos de eletroforese, *western blot* e ELISA para a análise de tuberculinas PPD bovinas, aliada ao resultado de correlação positiva entre potência e ELISA, poderão contribuir para a geração de novos testes de controle de qualidade aplicados durante e após a produção desse antígeno, possibilitando uma redução na utilização de animais de experimentação.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDWELL, F. E.; WEDLOCK, D. N.; BUDDLE, B. M. Bacterial metabolismo, cyotkine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, p. 45-51. 1996.
- ALITO, A.; MCNAIR, J.; GIRVIN, R. M.; ZUMARRAGA, M.; BIGI, F.; POLLOCK, J. M.; CATALDI, A. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1523-1531. 2003.
- ARMSTRONG, J. A., HART, P. D. Responde of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusions of lisosomes with phagosomes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 134, n. 3, p. 713-740. 1971.
- BARDAROV, S. S.; KRIAKOV, J.; KARAKASHYAN, A.; SIRAKOVA, T. D.; MARKOV, K. Characterization of PPD protein antigens in whole cell lysates of *Mycobacteriurn bovis* BCG. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, p. 89-94. 1990.
- BECK, S. T.; LEITE, O. M.; ARRUDA, R. S.; FERREIRA, A. W. Combined Use of Western Blot/ELISA to Improve the Serological Diagnosis of Human Tuberculosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 35-43. 2005.
- BELTRÁN, P. K.; GUTIÉRREZ-ORTEGA, A.; PUEBLA-PÉREZ, A. M.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J. A.; FLORES-VALDEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ; R., MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ; M. ÁLVAREZ, A. H. Identification of immunodominant antigens of *Mycobacterium bovis* by expression library immunization. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 181-183. 2010.
- BERRÊDO-PINHO, M.; KALUME, D. E.; CORREA, P. R.; GOMES, L. H. F.; PEREIRA, M. P.; SILVA, R. F.; CASTELLO-BRANCO, L. R. R.; DEGRAVE, W. M.; MENDONÇA-LIMA, L. Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared to *M. bovis* BCG Pasteur. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 80, 12 p. 2011.
- BERTHET, F. X.; RASMUSSEN, P. B.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P.; GICQUEL, B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology**, v. 144, p. 3195-3203. 1998.
- BORSUK, S.; NEWCOMBE, J.; MENDUM, T. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; MCFADDEN, J. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. **Tuberculosis**, v. 89, p. 423-430. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006, 188 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria

de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2012, 401 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 64, de 23 de março de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 56, 23 mar. 1994. Seção 1, p. 10.

BUDDLE, B. M. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis**, v. 81, p. 125-132. 2001.

BUDDLE, B. M.; KEEN, D.; THOMSON, A.; JOWETT, G.; MCCARTHY, A. R.; HESLOP, J.; LISLE, G. W. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. **Research in Veterinary Science**, v. 59, p. 10-16. 1995.

BUDDLE, B. M.; PARLANE, N. A.; KEEN, D. L.; ALDWELL, F. E.; POLLOCK, J. M.; LIGHTBODY, K.; ANDERSEN, P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected Cattle by Using Recombinant Mycobacterial Antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 1-5. 1999.

BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N.; DENIS, M.; VORDEMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 151, p. 14-22. 2011.

CATALDI, A.; ROMANO, M. I.; BIGI, F. A *Western blot* characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 689-698. 1994.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Early Lesion Formation in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 27-44. 1998.

CHAMBERS, M. A.; CARTER, S. P.; WILSON, G. J.; JONES, G.; BROWN, E.; HEWINSON, R. G.; VORDEMEIER, M. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: an overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 175, p. 90-96. 2014.

CHO, Y. S.; JANG, Y. B.; LEE, S. E.; CHO, J. Y.; AHN, J. M.; HWANG, I.; HEO, E.; NAM, H. M.; CHO, D.; HER, M.; JEAN, Y. H.; JUNG, S. C.; KIM, J. M.; LEE, H. S.; LEE, K.; BELISLE, J. T. Short communication: Proteomic characterization of tuberculin purified protein derivative from *Mycobacterium bovis*. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 117-119. 2015.

COLLINS, F. M.; LAMB, J. R.; YOUNG, D. B. Biological Activity of Protein Antigens Isolated from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1260 – 1266. 1988.

DABORN, C. J.; GRANGE, J. M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. **British Veterinary Journal**, v. 149, p. 405-417. 1993.

DANIEL, T. M.; JANICKI, B. W. Mycobacterial Antigens: a Review of Their Isolation,

Chemistry, and Immunological Properties. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 1, p. 84-113. 1978.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J. C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOUY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P. R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882. 2003.

GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.; COLE, S. T.; HEWINSON, R. G. Genomics of *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis**, v. 81, p. 157-163. 2001

GRANGE, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81. p. 71-77. 2001.

GRANGE, J. M., YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 137-151. 1994.

GRIFFIN, J. F. T.; MACKINTOSH, C. G.; SLOBBE, L.; THOMSON, A. J., BUCHAN, G. S. Vaccine protocols to optimise the protective efficacy of BCG. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 3, p. 135-143. 1999.

GRIFFITH, A. S. Bovine Tuberculosis in the Human Subject. **Tubercle**, v. 18, p. 528-243. 1937.

GUPTA, V. K.; RAM, G. C.; BANSAL, M. P. Antigenic characterization of *Mycobacterium bovis* BCG culture filtrate. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 345-353. 1994.

HAGA, S.; YAMAGUCHI, R.; NAGAI, S.; MATSUO, K.; YAMAZAKI, A.; NAKAMURA, R. M. et al. Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 221-225. 1995.

HAVLIR, D. V.; WALLIS, R. S.; BOOM, W. H.; DANIEL, T. M.; CHERVENAK, K.; ELLNER, J. J. Human Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 665 – 670. 1991.

HARBOE, M.; NAGAI, S.; WIKER, H. G.; SLETTEN, K.; HAGA, S. Homology Between the MPB70 and MPB83 Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 42, p. 46-51. 1995.

HORWITZ, M. A.; LEE, B. W. E.; DILLON, B. J.; HARTH, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 1530 – 1534. 1995.

HUYGEN, K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-9. 2014.

- JUNGBLUT, P. R.; SCHAIBLE, U. E; MOLLENKOPF, H. J.; ZIMMY-ARNDT, U.; RAUPACH, B.; MATTOW, J.; HALADA, P.; LAMER, S.; HAGENS, K.; KAUFMANN, S. H. E. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1103-1117. 1999.
- KAMATH, A. T.; FENG, C. G.; MACDONALD, M.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. Differential Protective Efficacy of DNA Vaccines Expressing Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1702-1707. 1999.
- KANTOR, I. N., BIOCH, D.; ROSWURM, J. D. Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1233-4. 1978.
- KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 5-14. 1994.
- KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin America and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 111-118. 2006
- KARLSON, A. G.; LESSEL, E. F. *Mycobacterium bovis* nom. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 3, p. 273-282. 1970.
- KITAURA, H.; KINOMOTO, M.; YAMADA, T. Ribosomal protein L7 included in tuberculin purified protein derivative (PPD) is a major heat-resistant protein inducing strong delayed-type hypersensitivity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 50(6):580-7. 1999.
- KLAUSEN, J.; MAGNUSSON, M.; ANDERSEN, A. B.; KOCH, C. Characterization of purified protein derivative of tuberculin by use of monoclonal antibodies: isolation of delayed-type hypersensitivity reactive component from *M. tuberculosis* culture filtrate. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 40, p. 345-349. 1994.
- LAVAGNOLI, M. R.; AMORIM, B. M.; MACHADO, G. P.; DEMONER, L. C.; ZANINI, M. S.; ANTUNES, J. M. A. P. Tuberculose em bovinos no estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 71-78. 2010.
- LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A. L.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and Identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 319-323. 2003.
- LEPPER, A. W. D.; PEARSON, C. W. The route of infection in tuberculosis of beef cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, p. 266-267. 1973
- LEPPER, A. W.; PEARSON, C. W.; CORNER, L. A. Anergy to tuberculin in beef cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 214-216. 1977.
- LEW, J. M.; KAPOPOULOU, A.; JONES, L. M.; COLE, S. T. TubercuList - 10 years after. **Tuberculosis**, v. 91, p. 1-7. 2001.

LIÉBANA, E., ARANAZ, A., WELSH, M., NEILL, S. D., POLLOCK, J. M. In vitro T-cell activation of monocyte-derived macrophages by soluble messengers or cell-to-cell contact in bovine tuberculosis. **Immunology**, v. 100, p. 194-202. 2000.

LISLE, G. W.; BENGIS, R. G.; SCHMITT, S. M.; O'BRIEN, D. J. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 21, n. 2., p. 317-334. 2002.

LISLE, G. W.; MACKINTOSH, C. G.; BENGIS, R. G. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, n. 1, p. 86 – 111. 2001.

MATTOW, J.; SCHAIBLE, U. E.; SCHMIDT, F.; HAGENS, K.; SIEJAK, F.; BRESTRICH, G.; HAESELBARTH, G.; MÜLLER, E. C.; JUNGBLUT, P. R.; KAUFMANN, S. H. E. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3405-3420. 2003.

MATTOW, J.; SIEJAK, F.; HAGENS, K.; SCHMIDT, F.; KOEHLER, C.; TREUMANN, A.; SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of mycobacteria. **Proteomics**, v. 7, p. 1687-1701. 2007.

M'FADYEAN, J. What is the common method of infection in tuberculosis? **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 289-303. 1910.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M., COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and lung disease**, v. 77. p 103-108. 1996.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40 p. 111-124. 1994.

MÜLLER, B.; DÜRR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C. J. M.; PARSONS, S. D. C.; HELDEN, P. D. van; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* – induced Tuberculosis in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11. p. 899-908. 2013.

MURAKAMI, P. S; FUVERKI, R. B. N; NAKATANI, S. M; FILHO, I. R. B; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar: Umuarama**, v. 12, n. 1, p. 67-74. 2009.

NAGAI, S., MATSUMOTO, J., NAGASUGA, T. Specific Skin-Reactive Protein from Culture Filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection and Immunity**, v. 31, p. 1152-1160. 1981.

NEILL, S.D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81 (1/2). p 19-86. 2001.

NEILL, S. D.; HANNA, J.; MACKIE, D. P.; BRYSON, T. G. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. **Veterinary Record**, v. 131, n. 3, p.

45-47. 1992.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. G.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52. 1994.

OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES) - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.4.7. Bovine Tuberculosis. 2009.

OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CÂMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 395-400. 2007.

OPROMOLLA, D. V. A. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato", 2000. p. 7-11.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181-190. 2006.

PATHOLOGY OF INFECTIOUS DISEASES. Case 146. Tuberculous cystitis after intravesical BCG inoculation (56 y-o M). Disponível em: <<http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/case/case146.htm>>. Acesso em: 30/11/2016.

POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598. 2004.

POLLOCK, J.M.; GIRVIN, R. M.; LIGHTBODY, K. A.; CLEMENTS, R. A.; NEILL, S. D.; BUDDLE, B. M.; ANDERSEN, P. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. **Veterinary Record**, v. 146, p. 659-665. 2000.

POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; BASSETT, H.; CASSIDY, J. P.; COSTELLO, E.; AGGERBECK, H.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. Specific Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 Identify Tuberculosis-Infected Cattle. **Journal of Clin Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1856-1860. 2003.

POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; KENNEDY, H. E.; MACKIE, D. P.; NEILL, S. D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81 (1/2) p. 103-107. 2001.

POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P. Predominant Recognition of the ESAT-6 Protein in the First Phase of Infection with *Mycobacterium bovis* in Cattle. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2587-2592. 1997.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The Veterinary Journal**, v. 163. p 115-127. 2002.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108 p. 37-43. 2005

PORTAL PLANALTO. Responsável por 23% do PIB, Plano Safra impulsiona agropecuária. Disponível em: <<http://www2.planalto.gov.br/noticias/2015/06/responsavel-por-23-do-pib-plano-safra-impulsiona-agropecuaria>>. Acesso em: 15/06/2016.

PRITCHARD, D. G. A Century of Bovine Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 357-399. 1988.

RAVENEL, M. P. The intercommunicability of human and bovine tuberculosis. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 15, n. 112-146. 1902.

RENNIE, B.; FILION, L. G.; SMART, N. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 6:50. 2010.

RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research In Veterinary Science**, v. 50, p. 365-367. 1991.

ROOK, G. A. W.; STEELE, J.; BARNASS, S.; MACE, J.; STANFORD, J. L. Responsiveness to live *M. tuberculosis*, and common antigens, of sonicate-stimulated T cell lines from normal donors. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 63, p. 105 – 110. 1986.

ROTHEL, J. S.; JONES, S. L.; CORNER, L. A.; COX, J. C.; WOOD, P. R. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 4, p. 134-137. 1990.

ROWLAND, S.S.; RUCKERT, J. L.; CUMMINGS, P. J. Low molecular mass protein patterns in mycobacterial culture filtrates and purified protein derivatives. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23. p. 21-25. 1999.

ROXO, E. *M. bovis* as zoonose's agent. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.18, n.1, p.101-108. 1997.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, n.2, p.91-97, 1996.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose Bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo v.74, n.1, p.55-65. 2007.

RUNYON, E. H. Mycobacteria: An Overview. **Reviews of Infectious Diseases**, v.3, n. 5, p. 819-821. 1981.

RUSSEL, D. G.; STURGILL –KOSZYCKI, S.; VANHEYNINGEN, T.; COLLINS, H., SCHAIABLE, U. E. Why intracellular parasitism need not be a degrading experience for Mycobacterium. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 352, p. 1303-1310. 1997.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.;

ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 205-220. 2010.

SKINNER, M. A.; WEDLOCK, D. N.; BUDDLE, B. M. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, n. 1, p. 112-132. 2001.

SKJOT, R. L. V.; OETTINGER, T.; ROSENKRANDS, I.; RAVN, P.; BROCK, I.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. Comparative Evaluation of Low-Molecular-Mass Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Identifies Members of the ESAT-6 Family as Immunodominant T-Cell Antigens. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 214-220. 2000.

SMITH, T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 13, p. 417-470. 1898.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; SANTOS, M. P.; GANDA, M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 363-367. 2014.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E.; CONNELL, N. D.; KREISDWIRTH, B. N.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 9869-9874. 1997.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 339-345. 2006.

THOLE, J.; JANSSEN, R.; YOUNG, D. Mycobacterial antigens. Em: *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*. RATLEDGE, C.; DALE, J. Willey-Blackwell Science Ltd, 1999. p. 356-370.

VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R.; BRAGA, M. J. Determinantes do Uso de Medidas Sanitárias de Controle da Brucelose e Tuberculose Bovinas. Piracicaba: **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba v.49, n.1, p. 215-232. 2011.

VORDERMEIER, H.M.; COCKLE, P. C.; WHELAN, A.; RHODES, S.; PALMER, N.; BAKKER, D.; HEWINSON, R. G. Development of Diagnostic Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* Infection in Cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 675-682.

WELLS, W. F.; RATCLIFFE, H. L.; CRUMB, C. On the mechanisms of droplet nuclei infection. II. Quantitative experimental airborne tuberculosis in rabbits. **American Journal of Hygiene**, v. 47, p. 11-28. 1948.

WILLIAMS, R. S., HOY, W. A. The viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in faeces and in liquid manure. **Journal of Hygiene**, v. 3, p. 413-419. 1930.

YOUNG, D. B.; KAUFMANN, S. H. E.; HERMANS, P. W. M.; THOLE, J. E. R.



Mycobacterial protein antigens: a compilation. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 133-145. 1992.

**ANEXO 1 – RESULTADOS DE ANOVA DE UMA VIA (GRAPHPAD PRISM 7)  
UTILIZADOS PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

<b>F</b>	45.39
<b>Valor de P</b>	<0,0001
<b>Diferença significativa entre as médias (P &lt; 0.05)?</b>	Sim
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8955

## ANEXO 2 – RESULTADOS DO TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE TUKEY (GRAPHPAD PRISM 7) UTILIZADOS PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Teste de Tukey de múltiplas comparações	Diferença da média	95,00% CI of diff.	Significativa?	Valor de P ajustado
MP003/14 x MP003/14 SN	0.2927	0,07029 to 0,515	Sim	0.0011
MP003/14 x MP004/14	-0.1666	-0,3238 to -0,009312	Sim	0.0265
MP003/14 x MP004/14 SN	0.294	0,07162 to 0,5164	Sim	0.001
MP003/14 vs. MP005/14	0.201	0,04376 to 0,3582	Sim	0.0018
MP003/14 vs. MP005/14 SN	0.2833	0,06096 to 0,5057	Sim	0.0019
MP003/14 vs. MP005/14 Q	0.2642	0,107 to 0,4215	Sim	<0,0001
MP003/14 vs. MP005/14 Q SN	0.2903	0,06796 to 0,5127	Sim	0.0013
MP003/14 vs. MP006/14	0.2617	0,1044 to 0,4189	Sim	<0,0001
MP003/14 vs. MP006/14 SN	0.2947	0,07229 to 0,517	Sim	0.001
MP003/14 vs. MP007/14	-0.04744	-0,2047 to 0,1098	Não	0.9998
MP003/14 vs. MP007/14 SN	0.2857	0,06329 to 0,508	Sim	0.0017
MP003/14 vs. MP001/15	-0.2852	-0,4425 to -0,128	Sim	<0,0001
MP003/14 vs. MP001/15 SN	0.2907	0,06829 to 0,513	Sim	0.0012
MP003/14 vs. MP002/15	-0.3284	-0,4857 to -0,1712	Sim	<0,0001
MP003/14 vs. MP002/15 SN	0.266	0,04362 to 0,4884	Sim	0.0052
MP003/14 vs. MP004/15	-0.3313	-0,4886 to -0,1741	Sim	<0,0001
MP003/14 vs. MP004/15 SN	0.283	0,06062 to 0,5054	Sim	0.002
MP003/14 SN vs. MP004/14	-0.4592	-0,6816 to -0,2368	Sim	<0,0001
MP003/14 SN vs. MP004/14 SN	0.001333	-0,271 to 0,2737	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP005/14	-0.09167	-0,314 to 0,1307	Não	0.99
MP003/14 SN vs. MP005/14 SN	-0.009333	-0,2817 to 0,263	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP005/14 Q	-0.02844	-0,2508 to 0,1939	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP005/14 Q SN	-0.002333	-0,2747 to 0,27	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP006/14	-0.031	-0,2534 to 0,1914	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP006/14 SN	0.002	-0,2704 to 0,2744	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP007/14	-0.3401	-0,5625 to -0,1177	Sim	<0,0001
MP003/14 SN vs. MP007/14 SN	-0.007	-0,2794 to 0,2654	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP001/15	-0.5779	-0,8003 to -0,3555	Sim	<0,0001
MP003/14 SN vs. MP001/15 SN	-0.002	-0,2744 to 0,2704	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP002/15	-0.6211	-0,8435 to -0,3987	Sim	<0,0001
MP003/14 SN vs. MP002/15 SN	-0.02667	-0,299 to 0,2457	Não	>0,9999
MP003/14 SN vs. MP004/15	-0.624	-0,8464 to -0,4016	Sim	<0,0001
MP003/14 SN vs. MP004/15 SN	-0.009667	-0,282 to 0,2627	Não	>0,9999
MP004/14 vs. MP004/14 SN	0.4606	0,2382 to 0,6829	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP005/14	0.3676	0,2103 to 0,5248	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP005/14 SN	0.4499	0,2275 to 0,6723	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP005/14 Q	0.4308	0,2735 to 0,588	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP005/14 Q SN	0.4569	0,2345 to 0,6793	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP006/14	0.4282	0,271 to 0,5855	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP006/14 SN	0.4612	0,2388 to 0,6836	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP007/14	0.1191	-0,03813 to 0,2764	Não	0.3818
MP004/14 vs. MP007/14 SN	0.4522	0,2298 to 0,6746	Sim	<0,0001

MP004/14 vs. MP001/15	-0.1187	-0,2759 to 0,03858	Não	0.3885
MP004/14 vs. MP001/15 SN	0.4572	0,2348 to 0,6796	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP002/15	-0.1619	-0,3191 to -0,004646	Sim	0.0367
MP004/14 vs. MP002/15 SN	0.4326	0,2102 to 0,6549	Sim	<0,0001
MP004/14 vs. MP004/15	-0.1648	-0,322 to -0,007535	Sim	0.03
MP004/14 vs. MP004/15 SN	0.4496	0,2272 to 0,6719	Sim	<0,0001
MP004/14 SN vs. MP005/14	-0.093	-0,3154 to 0,1294	Não	0.9884
MP004/14 SN vs. MP005/14 SN	-0.01067	-0,283 to 0,2617	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP005/14 Q	-0.02978	-0,2522 to 0,1926	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP005/14 Q SN	-0.003667	-0,276 to 0,2687	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP006/14	-0.03233	-0,2547 to 0,19	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP006/14 SN	0.0006667	-0,2717 to 0,273	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP007/14	-0.3414	-0,5638 to -0,1191	Sim	<0,0001
MP004/14 SN vs. MP007/14 SN	-0.008333	-0,2807 to 0,264	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP001/15	-0.5792	-0,8016 to -0,3568	Sim	<0,0001
MP004/14 SN vs. MP001/15 SN	-0.003333	-0,2757 to 0,269	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP002/15	-0.6224	-0,8448 to -0,4001	Sim	<0,0001
MP004/14 SN vs. MP002/15 SN	-0.028	-0,3004 to 0,2444	Não	>0,9999
MP004/14 SN vs. MP004/15	-0.6253	-0,8477 to -0,403	Sim	<0,0001
MP004/14 SN vs. MP004/15 SN	-0.011	-0,2834 to 0,2614	Não	>0,9999
MP005/14 vs. MP005/14 SN	0.08233	-0,14 to 0,3047	Não	0.9969
MP005/14 vs. MP005/14 Q	0.06322	-0,09402 to 0,2205	Não	0.9923
MP005/14 vs. MP005/14 Q SN	0.08933	-0,133 to 0,3117	Não	0.9924
MP005/14 vs. MP006/14	0.06067	-0,09658 to 0,2179	Não	0.9951
MP005/14 vs. MP006/14 SN	0.09367	-0,1287 to 0,316	Não	0.9875
MP005/14 vs. MP007/14	-0.2484	-0,4057 to -0,0912	Sim	<0,0001
MP005/14 vs. MP007/14 SN	0.08467	-0,1377 to 0,307	Não	0.9958
MP005/14 vs. MP001/15	-0.4862	-0,6435 to -0,329	Sim	<0,0001
MP005/14 vs. MP001/15 SN	0.08967	-0,1327 to 0,312	Não	0.9921
MP005/14 vs. MP002/15	-0.5294	-0,6867 to -0,3722	Sim	<0,0001
MP005/14 vs. MP002/15 SN	0.065	-0,1574 to 0,2874	Não	0.9998
MP005/14 vs. MP004/15	-0.5323	-0,6896 to -0,3751	Sim	<0,0001
MP005/14 vs. MP004/15 SN	0.082	-0,1404 to 0,3044	Não	0.9971
MP005/14 SN vs. MP005/14 Q	-0.01911	-0,2415 to 0,2033	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP005/14 Q SN	0.007	-0,2654 to 0,2794	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP006/14	-0.02167	-0,244 to 0,2007	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP006/14 SN	0.01133	-0,261 to 0,2837	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP007/14	-0.3308	-0,5532 to -0,1084	Sim	<0,0001
MP005/14 SN vs. MP007/14 SN	0.002333	-0,27 to 0,2747	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP001/15	-0.5686	-0,7909 to -0,3462	Sim	<0,0001
MP005/14 SN vs. MP001/15 SN	0.007333	-0,265 to 0,2797	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP002/15	-0.6118	-0,8342 to -0,3894	Sim	<0,0001
MP005/14 SN vs. MP002/15 SN	-0.01733	-0,2897 to 0,255	Não	>0,9999
MP005/14 SN vs. MP004/15	-0.6147	-0,837 to -0,3923	Sim	<0,0001
MP005/14 SN vs. MP004/15 SN	-0.0003333	-0,2727 to 0,272	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP005/14 Q SN	0.02611	-0,1963 to 0,2485	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP006/14	-0.002556	-0,1598 to 0,1547	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP006/14 SN	0.03044	-0,1919 to 0,2528	Não	>0,9999

MP005/14 Q vs. MP007/14	-0.3117	-0,4689 to -0,1544	Sim	<0,0001
MP005/14 Q vs. MP007/14 SN	0.02144	-0,2009 to 0,2438	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP001/15	-0.5494	-0,7067 to -0,3922	Sim	<0,0001
MP005/14 Q vs. MP001/15 SN	0.02644	-0,1959 to 0,2488	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP002/15	-0.5927	-0,7499 to -0,4354	Sim	<0,0001
MP005/14 Q vs. MP002/15 SN	0.001778	-0,2206 to 0,2242	Não	>0,9999
MP005/14 Q vs. MP004/15	-0.5956	-0,7528 to -0,4383	Sim	<0,0001
MP005/14 Q vs. MP004/15 SN	0.01878	-0,2036 to 0,2412	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP006/14	-0.02867	-0,251 to 0,1937	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP006/14 SN	0.004333	-0,268 to 0,2767	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP007/14	-0.3378	-0,5602 to -0,1154	Sim	<0,0001
MP005/14 Q SN vs. MP007/14 SN	-0.004667	-0,277 to 0,2677	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP001/15	-0.5756	-0,7979 to -0,3532	Sim	<0,0001
MP005/14 Q SN vs. MP001/15 SN	0.0003333	-0,272 to 0,2727	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP002/15	-0.6188	-0,8412 to -0,3964	Sim	<0,0001
MP005/14 Q SN vs. MP002/15 SN	-0.02433	-0,2967 to 0,248	Não	>0,9999
MP005/14 Q SN vs. MP004/15	-0.6217	-0,844 to -0,3993	Sim	<0,0001
MP005/14 Q SN vs. MP004/15 SN	-0.007333	-0,2797 to 0,265	Não	>0,9999
MP006/14 vs. MP006/14 SN	0.033	-0,1894 to 0,2554	Não	>0,9999
MP006/14 vs. MP007/14	-0.3091	-0,4664 to -0,1519	Sim	<0,0001
MP006/14 vs. MP007/14 SN	0.024	-0,1984 to 0,2464	Não	>0,9999
MP006/14 vs. MP001/15	-0.5469	-0,7041 to -0,3896	Sim	<0,0001
MP006/14 vs. MP001/15 SN	0.029	-0,1934 to 0,2514	Não	>0,9999
MP006/14 vs. MP002/15	-0.5901	-0,7474 to -0,4329	Sim	<0,0001
MP006/14 vs. MP002/15 SN	0.004333	-0,218 to 0,2267	Não	>0,9999
MP006/14 vs. MP004/15	-0.593	-0,7502 to -0,4358	Sim	<0,0001
MP006/14 vs. MP004/15 SN	0.02133	-0,201 to 0,2437	Não	>0,9999
MP006/14 SN vs. MP007/14	-0.3421	-0,5645 to -0,1197	Sim	<0,0001
MP006/14 SN vs. MP007/14 SN	-0.009	-0,2814 to 0,2634	Não	>0,9999
MP006/14 SN vs. MP001/15	-0.5799	-0,8023 to -0,3575	Sim	<0,0001
MP006/14 SN vs. MP001/15 SN	-0.004	-0,2764 to 0,2684	Não	>0,9999
MP006/14 SN vs. MP002/15	-0.6231	-0,8455 to -0,4007	Sim	<0,0001
MP006/14 SN vs. MP002/15 SN	-0.02867	-0,301 to 0,2437	Não	>0,9999
MP006/14 SN vs. MP004/15	-0.626	-0,8484 to -0,4036	Sim	<0,0001
MP006/14 SN vs. MP004/15 SN	-0.01167	-0,284 to 0,2607	Não	>0,9999
MP007/14 vs. MP007/14 SN	0.3331	0,1107 to 0,5555	Sim	<0,0001
MP007/14 vs. MP001/15	-0.2378	-0,395 to -0,08053	Sim	<0,0001
MP007/14 vs. MP001/15 SN	0.3381	0,1157 to 0,5605	Sim	<0,0001
MP007/14 vs. MP002/15	-0.281	-0,4382 to -0,1238	Sim	<0,0001
MP007/14 vs. MP002/15 SN	0.3134	0,09107 to 0,5358	Sim	0.0003
MP007/14 vs. MP004/15	-0.2839	-0,4411 to -0,1266	Sim	<0,0001
MP007/14 vs. MP004/15 SN	0.3304	0,1081 to 0,5528	Sim	<0,0001
MP007/14 SN vs. MP001/15	-0.5709	-0,7933 to -0,3485	Sim	<0,0001
MP007/14 SN vs. MP001/15 SN	0.005	-0,2674 to 0,2774	Não	>0,9999
MP007/14 SN vs. MP002/15	-0.6141	-0,8365 to -0,3917	Sim	<0,0001
MP007/14 SN vs. MP002/15 SN	-0.01967	-0,292 to 0,2527	Não	>0,9999

MP007/14 SN vs. MP004/15	-0.617	-0,8394 to -0,3946	Sim	<0,0001
MP007/14 SN vs. MP004/15 SN	-0.002667	-0,275 to 0,2697	Não	>0,9999
MP001/15 vs. MP001/15 SN	0.5759	0,3535 to 0,7983	Sim	<0,0001
MP001/15 vs. MP002/15	-0.04322	-0,2005 to 0,114	Não	>0,9999
MP001/15 vs. MP002/15 SN	0.5512	0,3288 to 0,7736	Sim	<0,0001
MP001/15 vs. MP004/15	-0.04611	-0,2034 to 0,1111	Não	0.9998
MP001/15 vs. MP004/15 SN	0.5682	0,3458 to 0,7906	Sim	<0,0001
MP001/15 SN vs. MP002/15	-0.6191	-0,8415 to -0,3967	Sim	<0,0001
MP001/15 SN vs. MP002/15 SN	-0.02467	-0,297 to 0,2477	Não	>0,9999
MP001/15 SN vs. MP004/15	-0.622	-0,8444 to -0,3996	Sim	<0,0001
MP001/15 SN vs. MP004/15 SN	-0.007667	-0,28 to 0,2647	Não	>0,9999
MP002/15 vs. MP002/15 SN	0.5944	0,3721 to 0,8168	Sim	<0,0001
MP002/15 vs. MP004/15	-0.002889	-0,1601 to 0,1544	Não	>0,9999
MP002/15 vs. MP004/15 SN	0.6114	0,3891 to 0,8338	Sim	<0,0001
MP002/15 SN vs. MP004/15	-0.5973	-0,8197 to -0,375	Sim	<0,0001
MP002/15 SN vs. MP004/15 SN	0.017	-0,2554 to 0,2894	Não	>0,9999
MP004/15 vs. MP004/15 SN	0.6143	0,392 to 0,8367	Sim	<0,0001